

Postverlagsort Berlin

ZEITSCHRIFT FÜR ZELLFORSCHUNG UND MIKROSKOPISCHE ANATOMIE

HERAUSGEGEBEN UND REDIGIERT VON

W. BARGMANN
KIEL

B. SCHARER
NEW YORK

J. SEILER
ZÜRICH

55. BAND, 1. HEFT

MIT 86 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 17. AUGUST 1961)



SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1961

Z.
Zellforsch.

Preis DM 47.60

Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie

Begründet 1924 unter dem Titel: Zeitschrift für Zellen- und Gewebelehre. Redigiert von *R. Goldschmidt* und *W. von Möllendorf*. Bd. 2—28 (1938). Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie. (Bd. 1—20), 1934 als: Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie Abteilung B) herausgegeben von *R. Goldschmidt*, *W. von Möllendorf*, *H. Bauer*, *J. Seiler*. Bd. 29—33 (1944) Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie Abteilung A. Allgemeine Zellforschung und mikroskopische Anatomie. Herausgegeben und redigiert von *W. von Möllendorf* und *J. Seiler*, Berlin, Springer. Bd. 34—35 (1948—1950) Springer, Wien, ab Bd. 36 Springer, Berlin, ab Bd. 34 ohne den Untertitel Abteilung A, Allgemeine Zellforschung usw.

Ab Bd. 2 (1925) mit dem Untertitel: Fortsetzung des *SCHULTZE-WALDEYER-HERTWIGS*chen Archivs für mikroskopische Anatomie. (Dieses wurde begründet 1864. Bd. 1—13 (1876) herausgegeben von *Max Schultze*; Bd. 13, Heft 4, bis Bd. 35 (1890) herausgegeben von *v. La Valette St. George*, *W. Waldeyer*; Bd. 36—43 (1894) herausgegeben von *O. Hertwig*, *v. La Valette St. George*, *W. Waldeyer*. Ab Bd. 44 als Archiv f. mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte, ab Bd. 77—95 (1910—1922) in 2 Abteilungen. Bd. 1—95, Bonn, Cohen. Ab Bd. 96 Berlin, Springer. Fortsetzung Bd. 98—104 (1923—1925) Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik. Herausgegeben von *W. Roux*, *H. Braus*, *H. Spemann*.)

Die Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie steht Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der beschreibenden und experimentellen Zellen- und Gewebelehre sowie dem Gebiet der mikroskopischen Anatomie des Menschen und der Tiere offen, wobei Arbeiten mit funktionellem und experimentellem Inhalt bevorzugt werden.

Arbeiten karyologischen Inhalts werden an die Zeitschrift „Chromosoma“, Arbeiten zur histochemischen und histophysikalischen Grundlagenforschung, insbesondere ihrer Methodik, an die Abteilung „Histochemie“ weitergeleitet.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Alle Manuskripte sind zu senden und Anfragen zu richten an:

Prof. Dr. W. Bargmann, Kiel, Anatomisches Institut der Universität, Neue Universität, Eingang F 1,

Prof. Dr. Berta Scharer, Albert Einstein College of Medicine, Dept. of Anatomy, Eastchester Road and Morris Park Avenue, New York 61, N.Y., USA,

Prof. Dr. J. Seiler, Zürich 6, Sonnegstr. 45.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301, Fernschreibnummer 01-83319
Heidelberg 1, Postfach 3027, Fernsprecher 27901, Fernschreibnummer 04-61 723

55. Band

Inhaltsverzeichnis

1. Heft Seite

ANDRES, K. H., Untersuchungen über den Feinbau von Spinalganglien. Mit 28 Textabbildungen	1
ANDRES, K. H., Untersuchungen über morphologische Veränderungen in Spinalganglien während der retrograden Degeneration. Mit 18 Textabbildungen	49
FUJITA, H., An electron microscopic study of the adrenal cortical tissue of the domestic fowl. With 5 Figures in the Text	80
FERREIRA, J. F. D., Sur la structure et le pouvoir phagocytaire des plaquettes sanguines. Avec 8 Figures dans le Texte	89
GROHMANN, D., Mitotische Wachstumsintensität des embryonalen und fetalen Hühnchenherzens und ihre Bedeutung für die Entstehung von Herzmißbildungen. Mit 9 Textabbildungen	104
ALESCIO, T., Sul comportamento del polmone embrionale di pollo coltivato in vitro. Con 18 figure nel testo	123

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Uppsala (Direktor: Prof. Dr. B. REXED)
UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN FEINBAU VON SPINALGANGLIEN*

Von
K. H. ANDRES

Mit 28 Textabbildungen
(Eingegangen am 11. April 1961)

Inhalt	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methodik	2
III. Ergebnisse	4
1. Capsula fibrosa und Endoneurium	4
2. Satelliten	12
3. Perikarya	15
a) Topographie und Gestalt S. 15. — b) Zytoplasma S. 18. — c) Zellkern S. 27. — d) Perikaryotypen S. 32.	
Zusammenfassung	42
Literatur	43

I. Einleitung

Die ersten elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Spinalganglienzellen (BEAMS, VAN BREEMEN, NEWFANG und EVANS 1952 und HOSSACK und WYBURN 1954) brachten nur wenig verwertbare Ergebnisse. Auch die Arbeiten von DAWSON, HOSSACK und WYBURN (1955) und von HESS (1955) unterlagen noch technisch bedingten Mängeln. Trotzdem verdanken wir diesen Autoren, insbesondere aber PALAY und PALADE (1953, 1955) die grundlegenden neuen Vorstellungen über den Aufbau der Spinalganglienzelle. Die Ultrastruktur der Nissl-Schollen, des Golgi-Apparates, der Mitochondrien und des Neuroplasmas wurde in diesen Arbeiten ausführlich beschrieben.

Dagegen ist unsere Kenntnis über den Feinbau des Ganglieninterstitiums, einschließlich der Gefäße und der Perikaryahüllen, noch sehr lückenhaft. WYBURN (1958) bringt in seiner Darstellung der Satellitenzellen insoweit eine endgültige Klärung der Zellgrenzverhältnisse als sicher kein Hüllplasmodium im Sinne von STÖHR jr. (1941, 1951/53) vorliegt. Er geht aber im übrigen nicht ausführlich auf besondere Einzelheiten der Ultrastruktur ein. CERVÓS-NAVARRO (1960) und PANNESE (1960) konnten die Befunde WYBURNS bestätigen.

Weiterhin hat der Ganglienzellkern in der elektronenmikroskopischen Forschung bisher wenig Beachtung gefunden. Diese Tatsache erscheint erstaunlich, da Nervenzellkerne von jeher beliebte lichtmikroskopische Objekte zum Studium der Funktion von Nukleolus und Interphasenkern waren (MJAASOJEDOFF 1927, EINARSON 1933, KÖRNER 1937 a, b, LANDSTRÖM, CASPERSSON und WOHLFAHRT 1940/41, HYDÉN 1944, HERTL 1955 u. a.). PALAY und PALADE (1955) weisen auf elektronenmikroskopische Arbeiten über Kerne anderer Zellarten hin und

* Durchgeführt mit Unterstützung durch den Schwedischen Medizinischen Forschungsrat.
Z. Zellforsch., Bd. 55

verzichten auf eine systematische Untersuchung. CERVÓS-NAVARRO (1959) beschreibt das Kernkörperchen lediglich als einen „Bereich, in dem granuläre Elemente eine grobkörnigere Struktur aufweisen als der Rest des Kernes“.

Ungeklärt blieben schließlich noch Fragen über die verschiedenen Ganglienzelltypen. Das Auftreten von kleinen, „dichten“ Perikarya neben großen, „hellen“ Zellen ist seit langem bekannt (KONEFF 1887, DAAE 1888, FLEMMING 1895) und wird auch in neuerer Zeit lichtmikroskopisch (BACSICH und WYBURN 1953, SCHARF und OSTER 1957) und elektronenmikroskopisch (HOSSACK und WYBURN 1954, DAWSON, HOSSACK und WYBURN 1955, HESS 1955) bestätigt. Trotzdem liegen zahlreiche einander widersprechende Beobachtungen vor. Hierin sieht SCHARF (1958) am Schluß seines umfassenden Handbuchbeitrages über sensible Ganglien ein Hauptproblem der heutigen Ganglienzellforschung. CERVÓS-NAVARRO (1959) kommt zu dem Schluß, daß die Elektronenmikroskopie noch keine sichere Korrelation zu der von der Lichtmikroskopie her bekannten Einteilung in „helle“ und „dunkle“ Spinalganglienzellen erbracht habe. Die Aufstellung einer solchen Korrelation würde die Durchsicht eines umfangreichen Materials erfordern. Dies ist aber in der Elektronenmikroskopie infolge der geringen Präparatgröße und des sehr kleinen Gesichtsfeldes mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden.

Mit einander ergänzenden phasenkontrast- und elektronenoptischen Auswertungen von Dünnschnitten habe ich in den vorliegenden Untersuchungen vom licht- zum elektronenoptischen Bild Beziehungen aufstellen können. Ein direkter Vergleich der Bilder war möglich, weil die Objektstrukturen der für das Phasenkontrastverfahren in Paraffinum liquidum eingebetteten, etwa 500 m μ dünnen Methacrylatschnitte denselben Schwärzungsgrad zeigten wie die 300 Å-Schnitte im Elektronenmikroskop.

Das Anliegen dieser Arbeit ist eine Darstellung des Aufbaus von Rattenspinalganglien unter Anwendung der eben erwähnten kombinierten Methoden. Dabei gehe ich auf die noch offenen Fragen über die Feinstruktur der Formteile des Spinalganglions näher ein. Diese betreffen, wie anfangs ausgeführt, besonders das Endoneurium, die Satellitenzellen, den Ganglienzellkern und die Perikaryotypen.

II. Material und Methodik

Es kamen 30 Spinalganglien (L 5 und L 6) von 250–300 g schweren weiblichen Albino-Ratten und die beiden kranialen Ganglien aus dem Truncus sympathicus eines erwachsenen Kaninchens zur Untersuchung. In Phenobarbital-Äther-Narkose habe ich jedes einzelne Ganglion mit größter Vorsicht freigelegt. Unmittelbar nach der Exstirpation erfolgte die Übertragung in 2%ige, auf pH 7,5 gepufferte Osmiumtetroxydlösung (SJÖSTRAND 1953). Die Fixierungsdauer betrug etwa 2 Std. Nach den ersten 20 min wurde das jeweilige Ganglion in vier gleich große Stücke zerlegt und dann in einer frisch bereiteten Lösung gleicher Zusammensetzung weiterfixiert.

Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe. Vor der Imprägnierung mit n-Butyl-Methacrylat wurden die Objektstückchen 1 Std lang in Azeton gelegt und vor der Polymerisation in vopolymerisiertes Methacrylat übertragen. Gehärtet wurde bei einer Temperatur von 70° C unter Stickstoffatmosphäre (MOORE und GRIMLEY 1957).

Die mit dem Porter-Blum-Ultramikrotom hergestellten Dünnschnitte kontrastierte ich nach Angaben von WATSON (1958) mit Uranylazetat.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen diente ein RCA-3B-Gerät (Strahlspannung von 50 kV) unter Verwendung von Gevaert-Litholine-Platten. Mit Hilfe dieser

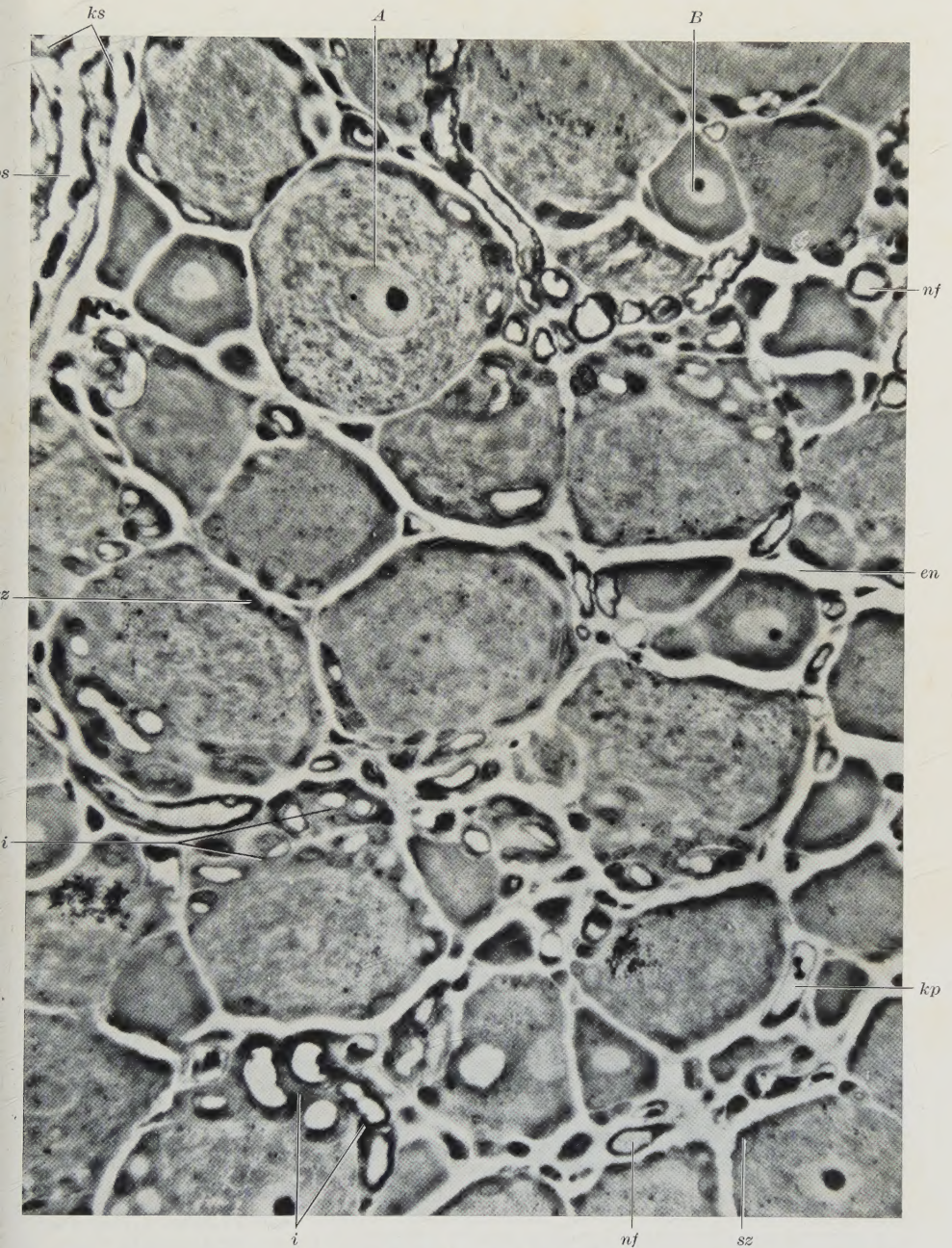


Abb. 1. Ausschnitt aus der Mantelschicht eines lumbalen Spinalganglions der Ratte. Die dicht gedrängt liegenden Perikarya sind durch den artifiziell etwas erweiterten endoneuralen Spaltraum (*en*) gegeneinander abgegrenzt. Deutlich sind die „großen hellen Zellen“ (*A*) von den „kleinen dunklen Zellen“ (*B*) zu unterscheiden. Die Ganglienkapsel (*ks*) enthält einen mit Endothel ausgekleideten Spaltraum (*ps*). Initialglomerulum (*i*), Satellitenzellen (*sz*), Nervenfasern (*nf*), Kapillaren (*kp*).

Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 520 ×

Photo-Emulsion ließen sich bei herausgenommener Aperturblinde nahezu astigmatismusfreie Bilder von ausgezeichneter Schärfe herstellen (HANZON 1958). Mikroskopvergrößerung 2400–8500fach.

Vergleichende phasenkontrastmikroskopische Studien an Dünnschnitten desselben Materials erlaubten präliminare Kontrollen über Fixierungszustand, Einbettung und Objektsituation, sowie Übersichtsuntersuchungen.

Nähere Angaben zur Methodik, insbesondere auch zur Frage der Artefaktbildung während der Präparation und Fixierung siehe ANDRES (1961a).

III. Ergebnisse

1. Capsula fibrosa und Endoneurium

Die ovalen, etwas abgeflachten Spinalganglien liegen bei Ratten noch innerhalb des Canalis vertebralis (GREENE 1949). Als Untersuchungsobjekte waren die als Hauptganglien des N. ischiadicus relativ großen Nervenzellknoten L 5 und L 6 besonders günstig. Ihre Länge beträgt 1,8 mm.

Die bindegewebige Hülle der Dura spinalis geht unmittelbar in die Ganglienkapsel über. Sie ist so zart, daß die von mir zur Fixierung benutzte Osmiumtetroxydlösung auch durch ihre, bei vorsichtiger Exstirpation unverletzte Oberfläche leicht in die Tiefe eindringen kann. In der Capsula fibrosa wurde häufig ein mit Endothel ausgekleideter Spaltraum (Abb. 1) gesehen, der wahrscheinlich den Anfang der aus der Tunica arachnoidalis hervorgehenden perifasciculären Scheide darstellt (KEY und RETZIUS 1873, BRIERLEY 1950, 1955). Ein zweischichtiges „Neurothel“ ohne Spaltraum, wie es von LEHMANN (1957) als

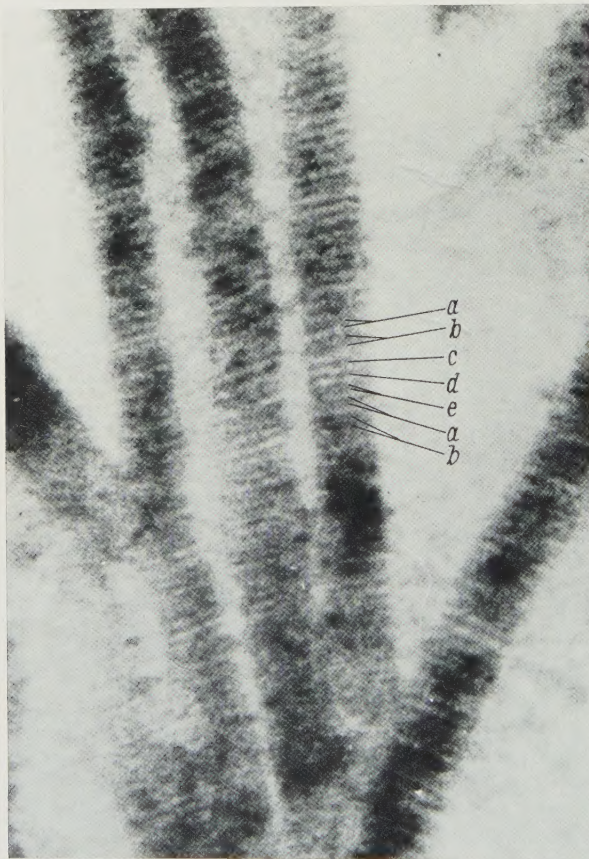


Abb. 2. Kollagenfibrillen aus dem Endoneurium eines Ratten-Spinalganglions. Die Streifenperiode (a—e) ist nach Schnittkontrastierung mit Uranylazetat besonders gut zu erkennen. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 140000 ×

perineurale Diffusionsbarriere beschrieben wurde, konnte ich nicht beobachten.

Das Endoneurium erscheint im Phasenkontrastübersichtsbild als optisch leerer Spaltraum (Abb. 1). Seine Ausdehnung ist durch eine geringgradige Schrumpfung der Zellen meist etwas erweitert. Die Spalten enthalten zahlreiche Kollagenfibrillen, die — oft zu kleinen Bündeln aggregiert und von der Capsula fibrosa

ausgehend — das Innere des Ganglions durchdringen (Abb. 5). Sie umspinnen in lockeren Geflechten die Membran- und Zellhüllen der Perikarya, Nerven und Gefäße. Damit entsprechen sie den Elementen, die die von KEY und RETZIUS (1875/76) beschriebene, bindegewebige Scheide, sowie die Levische Gitterfaserhülle bilden (vgl. S. 12). Der Querdurchmesser der einzelnen runden bis polygonalen Fibrillen beträgt 300—500 Å; im Längsschnitt zeigen sie die seit SCHMITT u. Mitarb. (1942) und WOLPERS (1944) bekannte, 640 Å breite Streifenperiode. In meinen mit Uranylazetat behandelten Präparaten entspricht der Kontrast der einzelnen Banden dem Bild, das KÜHN und GEBHARDT (1960) nach Chromsulfatimprägnierung erzeugten (Abb. 2).

Die *fibrozytären Endoneuralzellen* (GAGEL 1935) findet man in den Endoneuralspalten relativ selten. Ihr Verhältnis zu den Satellitenzellen schwankt zwischen 1:6 und 1:15. Hierauf wird auch von CERVÓS-NAVARRO (1960) hingewiesen. Elektronenoptisch sind sie besonders daran zu erkennen, daß sie als Wanderzellen keine Basalmembran tragen. Die Ultrastruktur ihres Zytoplasmas zeigt reichlich endoplasmatisches Retikulum, in das nicht selten Abschnitte eingebaut sind, die etwa 500 Å weite, von dichter strukturiertem Material umgebene Poren enthalten (Abb. 3). *Porenhaltige Ergastoplasmamembranen*, die vielfach in Schichten übereinanderliegen (*annulated lamellae*), wurden bisher nur in Oozyten, Spermatozyten, Spermatiden und Pankreasazinzellen gesehen (SWIFT 1956, AFZELIUS 1957, REBHUN 1957 und RUTHMANN 1958). Morphologisch identische Poren finden sich bekanntlich in Kernmembranen (s. Abschnitt III, 3c und Abb. 18).

Andere geformte Plasmabestandteile, wie Mitochondrien, Fetttropfen mit eingebuchteter, membranloser Oberfläche und osmiophile Zytosomen liegen in lockerer Verteilung. Die Zytosomen erreichen gelegentlich eine beträchtliche Größe (Abb. 4). Sie bilden dann ein buntes Konglomerat aus optisch leeren Bläschen, größeren opaken Bezirken und kontrastreichen Schollen. Abgesehen von den hellen Bezirken sind die Partikel noch dicht mit feinen schwarzen Granula tingiert.

Die Kerne der Endoneuralzellen enthalten wie die Endothelkerne vorwiegend randständige Chromatinverdichtungen. Auf die Ultrastruktur von Karyoplasma und Nukleolus wird im Zusammenhang mit der Beschreibung der Ganglienzellkerne näher eingegangen.

In den Phasenkontrastübersichten der Dünnschnitte sind die Endothelrohre der *Blutkapillaren* meist als feine, teilweise etwas verdickte Konturen gut zu erkennen (Abb. 1 und 14). Nach Untersuchungen von ADAMKIEWICZ (1900), BÜHLER (1898) und BRIERLEY (1955) sollen sich die Gefäßschlingen um jede Ganglienzelle winden. Diese Angaben scheinen auch für die von mir untersuchten Ganglien zuzutreffen. Perlschnurartige Erweiterungen und Sinusoide, die nach BERGMANN und ALEXANDER (1941) und BRIERLEY (1955) in Ganglien von Erwachsenen ausgebildet sind, konnte ich jedoch nur in Einzelfällen sehen (Abb. 27). Sie erreichen einen Durchmesser von 30 μ . Ihre Abgrenzung gegen Venulen ist ohne Rekonstruktion aus Schnittserien aber kaum durchzuführen.

In der elektronenoptischen Aufnahme erscheint die Kapillarwand als ein porenloses *Endothelrohr*. Die einzelnen Endothelien überlappen sich an den Zellgrenzen und bilden hier streckenweise haftzonenartige Verdichtungen des

Plasmalemmas. Das Endothelrohr wird von einer in sich geschlossenen *Basalmembran* umgeben, die im wesentlichen aus einem 500 Å dicken Fibrillenfilz

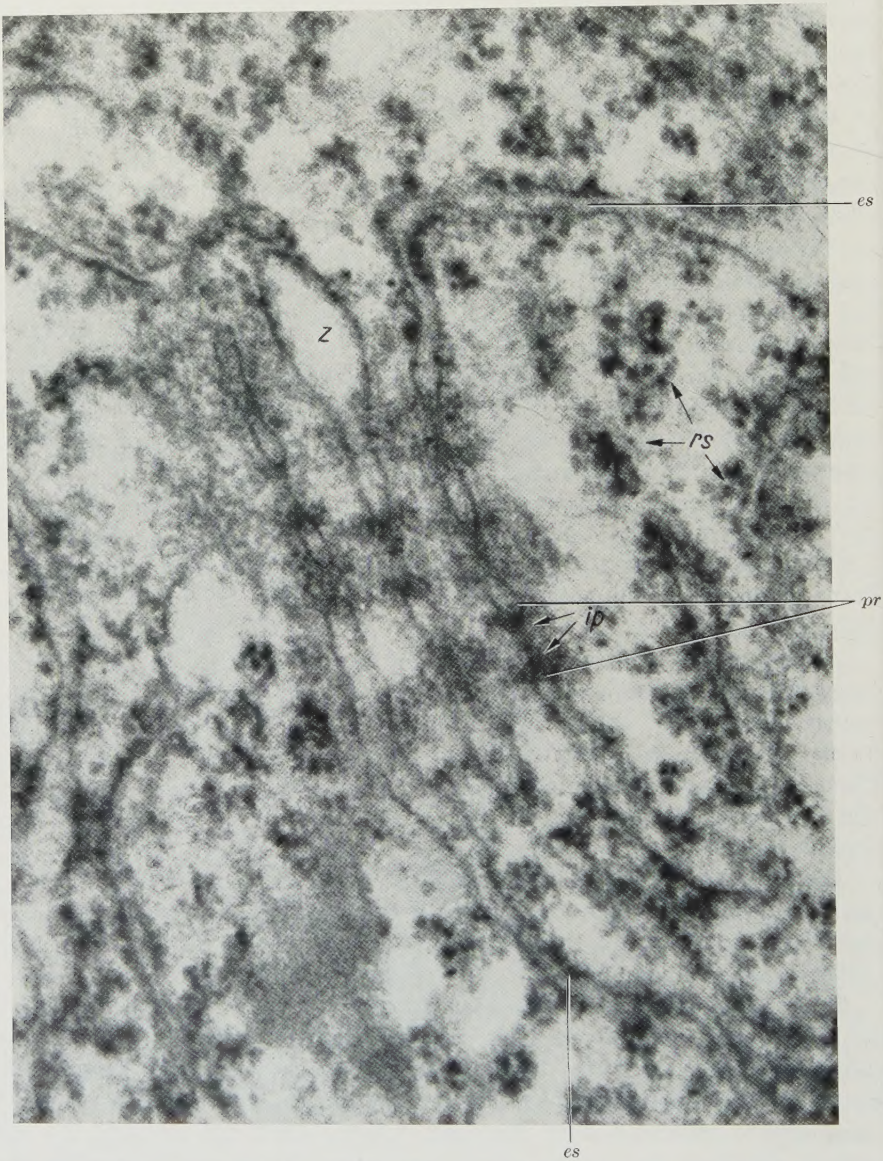


Abb. 3. Porenhaltige Abschnitte im endoplasmatischen Retikulum einer Endoneuralzelle aus einem Ratten-Spinalganglion. Innere Porenweite (*ip*) 500 Å, Durchmesser der Porenringzone (*pr*) 1100 Å, Ribosomen (RNS-Granula) (*rs*), Ergastoplasmaspalten (*cs*), Zisterne (*z*). Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 87 000 ×

besteht, dessen einzelne Fibrillen oder Filamente einen Querdurchmesser von 50—90 Å haben. Zwischen der Endothelaußenfläche und diesem Filz liegt eine optisch hellere, etwa 150 Å breite Schicht, in der sich ebenfalls feinste Filamente — allerdings in viel spärlicherer Verteilung — finden. Über den foveolenartigen

Zellmembraneinbuchtungen („Membranvesikulation“) kann diese helle, *intermediäre Schicht* sinusartig erweitert sein. Gelegentlich kommen auch größere



Abb. 4. Großes Zytosom aus einer Endoneuralzelle. Zellkern der Endoneuralzelle (*n*), Querschnitte von Kollagenfibrillen (*kf*), Basalmembran des Satellitenmantels (*bm*), Verzahnung von Satellitenzellen im Bereich des Initialglomerulums (*sg*). Endoneuralspalt (*en*). Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 42 000 ×

Spalträume zwischen der Endothelzellmembran und der dichten Zone der Basalmembran vor (Abb. 5).

Im Gegensatz zu diesen Befunden konnten BARGMANN, KNOOP und SCHIEBLER (1955), PEASE (1955), RHODIN (1955) und THIEL (1958) im Nierenglomerulum



Abb. 5. Beziehung zwischen Kapillarlichtung (*l*) und Spinalganglienzelle (*glz*). Endothelzelle (*ed*), Endothelkern (*n*), Membranvesikulation (Ausdruck der Zytopenmpsis) (*mv*), Basalmembran (*bm*), Lamina densa (*ld*), Lamina rara (*lr*), Perizytenausläufer (*pz*), Satellitenzellen (*sz*), Zellgrenze zwischen zwei Satellitenzellen (*szs*) und zwischen Satellitenhülle und Perikaryon (*szq*), Nervenzellfortsätze (*nf*), Mitochondrion (*mi*), Vesikel (vgl. Abb. 9) (*v*), Endoneuralspalt (*en*), Kollagenfibrillen (*kf*). Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 43 000 ×

einen dreischichtigen Aufbau des Kapillargrundhäutchens feststellen. Nach einer Einteilung von THIEL lassen sich dort eine *Lamina rara interna*, die mit der von

mir beschriebenen intermediären Schicht übereinstimmen dürfte, eine dem Filz entsprechende *Lamina densa* und schließlich eine gegen die Deckzellen grenzende

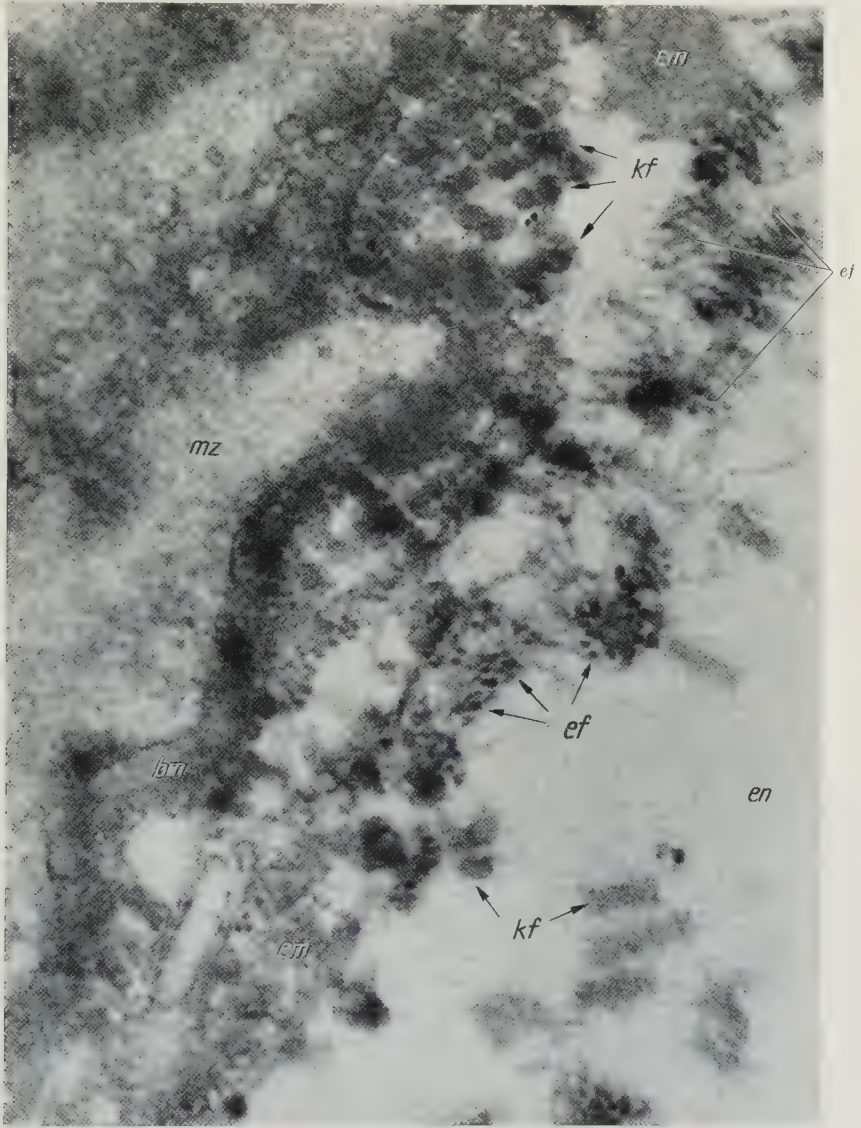


Abb. 6. Feinstruktur der Elastica externa einer Arteriole aus einem Ratten-Spinalganglion. Die elastischen Filamente (*ef*) sind im Schnitt quer und längs getroffen. Elastomucin (*em*), Basalmembran der Muskelzelle (*bm*), Sarkoplasma (*mz*), Endoneuralspalt (*en*), Kollagenfibrillen (*kf*). Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 80 000 \times

Lamina rara externa unterscheiden. Eine solche dritte Basalmembranschicht kommt an den Kapillaren der Spinalganglien nicht vor. Hier haben die *kollagenen Fibrillen* des Endoneuriums unmittelbaren Kontakt zur *Lamina densa* des Grundhäutchens (Abb. 5). Eine besondere Verankerung ist aber nicht zu erkennen. Gelegentlich sieht man jedoch zwischen den Kollagenfibrillen feinere Filamente

ohne Streifenperiode mit einem Querdurchmesser von 80—150 Å, die aus der Basalmembran hervorzugehen scheinen. Ihre Anzahl ist in der Umgebung von

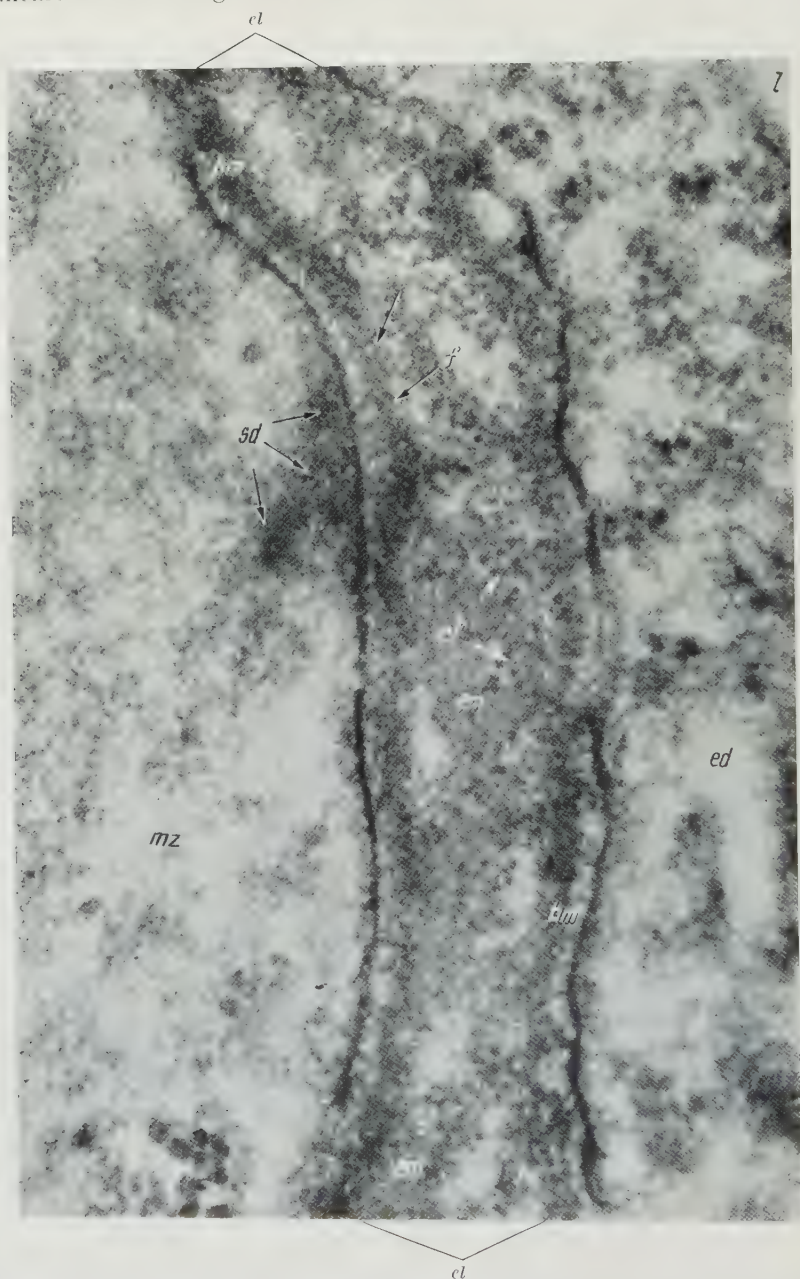


Abb. 7. *Elastica interna* (*el*) einer Arteriole aus einem Ratten-Spinalganglion. Strahlig angeordnete Filamente (*f*) im Bereich der *Lamina rara* der Basalmembran (*bm*) einer Muskelzelle (*mz*). Querschnitte von elastischen Filamenten (*ef*), Elastomucin (*em*), sarkoplasmatische Verdichtung (*sd*), Endothelzelle mit Basalmembran (*ed*), Gefäßlichtung (*l*). Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 80000 ×

Arteriolen stark vermehrt (Abb. 6), wo sie offensichtlich die Formelemente einer *Elastica externa* bilden. Auch im Bereich der *Elastica interna*, die zwischen den

Basalmembranen des Endothelrohres und der Muskelzellen als wenig strukturiertes, helles Material (Elastomucin) liegt, sieht man vielfach diese Filamente. KARRER (1958) beschreibt aus elastischen Fasern austretende, morphologisch identische Filamente in Lungenalveolen.

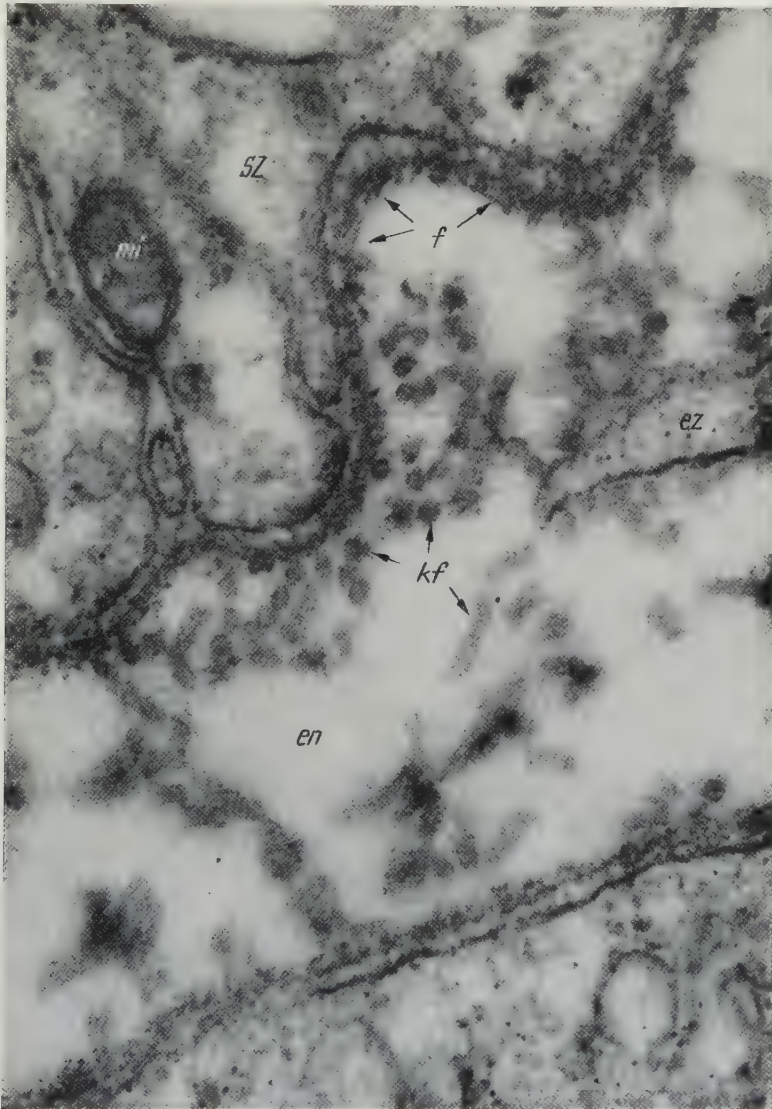


Abb. 8. Feinstruktur der Basalmembran (bm) von Satellitenzellen (sz) aus einem Ratten-Spinalganglion. Filamente (f), Kollagenfibrillen (kf), Endoneuralspalt (en), Ausläufer einer Endoneurialzelle (ez). Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 70000 \times

Die „*Lamina rara*“ des Muskelzellgrundhäutchens ist gleichmäßiger strukturiert als die der Kapillaren und Perizyten. Von membranständigen „*sarkoplasmatischen Verdichtungszone*n“ aus wird sie durch strahlenartig angeordnete Filamente überbrückt (Abb. 7). Da die Basalmembranen den Volumenschwankungen und Oberflächenveränderungen der zugehörigen Zellen nachgeben müssen,

dürfte ihnen neben der Wirkung als *Diffusionsbarriere* (PAPPENHEIMER 1953) auch eine *mechanische Funktion* zukommen. Hierfür scheint die häufig anzutreffende enge Verflechtung der Basalmembran mit elastischen Filamenten zu sprechen.

Die *Perizyten* sind in der Feinstruktur den Endothelzellen sehr ähnlich. Die Anzahl der Membranfoveolen und Zytoplasmabläschen ist bei den Perizyten jedoch geringer. Der Zelleib und die Ausläufer sitzen unmittelbar dem Endothelgrundhäutchen auf und sind gegen den endoneuralen Gewebsspalt ebenfalls durch eine Basalmembran abgegrenzt (Abb. 5).

In diesem Aufbau stimmen die Kapillaren des Endoneuriums mit dem von BARGMANN (1958) für das interstitielle Bindegewebe als charakteristisch beschriebenen Kapillartyp überein.

2. Satelliten (Mantelzellen, Gliazellen)

Wie die Blutgefäße sind auch die Mantelzellen der Perikarya von einer gegen das Endoneurium gerichteten *porenlosen Basalmembran* überzogen. Im Vergleich zum Gefäßgrundhäutchen ist diese Basalmembran mit 200–400 Å wohl dünner als jenes, aber in der Feinstruktur mit ihm identisch (Abb. 5 und 8). Die feinen Filamente, die den Filz der *Lamina densa* bilden, sind vermutlich das Substrat für die von LEVI 1907 dargestellte *Gitterfaserhülle* der Perikarya, der allerdings auch jene kollagenen Fibrillen zuzurechnen sind, die — aus den Faserbündeln der Endoneuralscheide hervorgehend — engen Kontakt zum Grundhäutchen haben.

Die Basalmembran des Satellitenmantels geht kontinuierlich in das Grundhäutchen des Neuriten über, das elektronenmikroskopisch an markhaltigen und marklosen Fasern bereits mehrfach festgestellt worden ist (GASSER 1952, 1955, FERNÁNDEZ-MORÁN 1950, 1954, 1955 und ELFVIN 1958). Letzteres wird ebenfalls mit der von PLENK und LAIDLAW (1930) entdeckten Gitterfaserscheide der Nervenfasern in Verbindung gebracht (LEHMANN 1958).

Die Satelliten umgeben die einzelnen Ganglienzellkörper in einer einzelligen Schicht. Gar nicht so selten sieht man auch zwei Ganglienzellen in einer Satellitenkapsel liegen. Solche, aus der Lichtmikroskopie als sog. *Zwillingszellen* bekannten Paare, setzen sich in den von mir untersuchten Rattenspinalganglien meist aus einem größeren, hellen und einem kleineren, dunklen Perikaryon zusammen.

Einen entsprechenden Befund erhoben DAWSON, HOSSACK und WYBURN (1955) am Kaninchen. In einem Fall konnte ich sogar drei Ganglienzellen in einer gemeinsamen Mantelzellhülle feststellen.

Die einzelnen Satelliten verzahnen und überlappen sich an den gegenseitigen Zellgrenzen. Im Bereich des Initialglomerulums können *fingerartige Gliazellen-ausläufer* so sehr miteinander verflochten sein, daß sie ohne Rekonstruktion bestimmten Zellindividuen nicht zugeordnet werden können. Zum Teil liegt auch regelrechte Zellmembranschichtung vor, die in lockerer Anordnung schon eine Art Markscheide darstellt. Wenn auch im Bereich des Initialglomerulums die Mantelzellen sukzessiv in die Schwannschen Zellen überzugehen scheinen, so beginnt die eigentliche Markscheide recht abrupt. Abbildungen, die dieses eindeutig demonstrieren, finden sich schon in der Arbeit von RETZIUS (1880).

Die Grenze zwischen den *Mantelzellen* und den *Perikarya* ist meist nicht besonders strukturiert. Sie besteht aus einem einfachen 100–120 Å breiten Interzellularspalt, der an zahlreichen Stellen zisternenartig auf maximal 1000 Å erweitert ist. Eine Basalmembran oder kollagene Fibrillen, wie sie von HOSSACK und WYBURN (1954) festgestellt wurden, konnte ich zwischen Satelliten- und Ganglienzelle nie beobachten. In Bereichen inniger Verzahnung erscheinen die Zellgrenzen infolge tangentialer Schnitfführung teilweise unscharf. Eine direkte zytoplasmatische Verbindung zwischen Satelliten und Perikaryon kommt aber sicher nicht vor. Die gegen die Satellitenhülle gerichtete Oberflächenmembran der Perikarya ist mit einer Dicke von 100–130 Å meist kontrastreicher als die normale, 70 Å messende Membran der Mantelzellen.

Die Satellitenhülle der Ganglienzellen kann streckenweise sehr dünn sein. Über den kleineren, „dichten“ Perikarya mißt ihre Schicht gelegentlich nicht mehr als 800–1000 Å. In dieser Größe ist sie natürlich lichtoptisch nicht zu sehen. Frühere Mitteilungen über das Fehlen einer Satellitenkapsel (v. LENHOSSEK 1906) betreffen deshalb gerade kleine sensible Zellen. Ganz selten trifft man in der Satellitenhülle tatsächlich einige μ große Lücken, worüber auch CERVÓS-NAVARRO (1960) kürzlich berichtet hat. In der Umgebung des Mantelzellkernes ist in der Regel mehr Zytoplasma vorhanden, so daß hier die Satellitenhülle eine Breite von 5–10 μ erreicht.

Gut fixierte Kerne der Hüllzellen sind meist oval bis rund konfiguriert und haben eine glatte Oberfläche. Ihr Durchmesser in der Längsachse beträgt etwa 6–8 μ . Im Phasenkontrastmikroskop erscheint das Karyoplasma homogen. Randständige Chromatinverdichtungen sind im Gegensatz zu den Endoneuralzellen und Endothelien weniger ausgeprägt, so daß die Satellitenkerne von den Kernen der zuletzt genannten Zellen schon in der Übersicht leicht zu unterscheiden sind. Das elektronenmikroskopische Bild zeigt eine entsprechend gleichmäßige Verteilung der Chromatingranula. Dagegen ist der Kernmembrancharakter dem der Endothel- und Endoneuralzellkernen sehr ähnlich. Da die elektronenmikroskopische Feinstruktur der Fibrillen und Granula innerhalb des Satellitenkernes mit den Befunden in Ganglienzellkernen übereinstimmt, sei auf die nähere Beschreibung in Abschnitt III, 3c verwiesen.

Das Zytoplasma der Satellitenzellen zeichnet sich an vielen Stellen durch Ansammlungen von 350–700 Å großen Bläschen aus. Diese *Vesikel* liegen nicht selten in unmittelbarer Nähe der gegen das Perikaryon gerichteten Zellmembran konzentriert; hierauf weist auch PANNESSE (1960) besonders hin. Die Zellgrenze zeigt dann einen sehr unregelmäßigen Verlauf. Offensichtlich dringen an diesen Punkten die Bläschen durch die Zellmembran in das Perikaryon ein (Abb. 9). Eine ähnliche Membrandurchwanderung beschreibt DE ROBERTIS (1958) an peripheren Synapsen. Dagegen konnte ich an Gliazellen keine regelrechte „Membranvesikulation“ beobachten, wie sie z. B. für Endothelien typisch ist (MOORE und RUSKA 1957). Deshalb möchte ich DE ROBERTIS und BENNET (1954) nicht zustimmen, wenn sie in den Zytoplasmabläschen der Satelliten den morphologischen Ausdruck eines transgliazitären Stofftransportes (Zytopempsis) sehen. Vielmehr scheinen die Vesikel ihren Ursprung in den in Kernnähe gelegenen Golgi-Zonen zu haben. Sie haben vielleicht nutritive Funktion oder sie stellen die von KORNMÜLLER (1950) postulierten Sekrettröpfchen dar, die zur Steuerung

der Erregbarkeit der Ganglienzelle dienen sollen. Dann entsprächen die Bläschen möglicherweise synaptischen Vesikeln. Perikaryon, Satelliten und die in ihnen

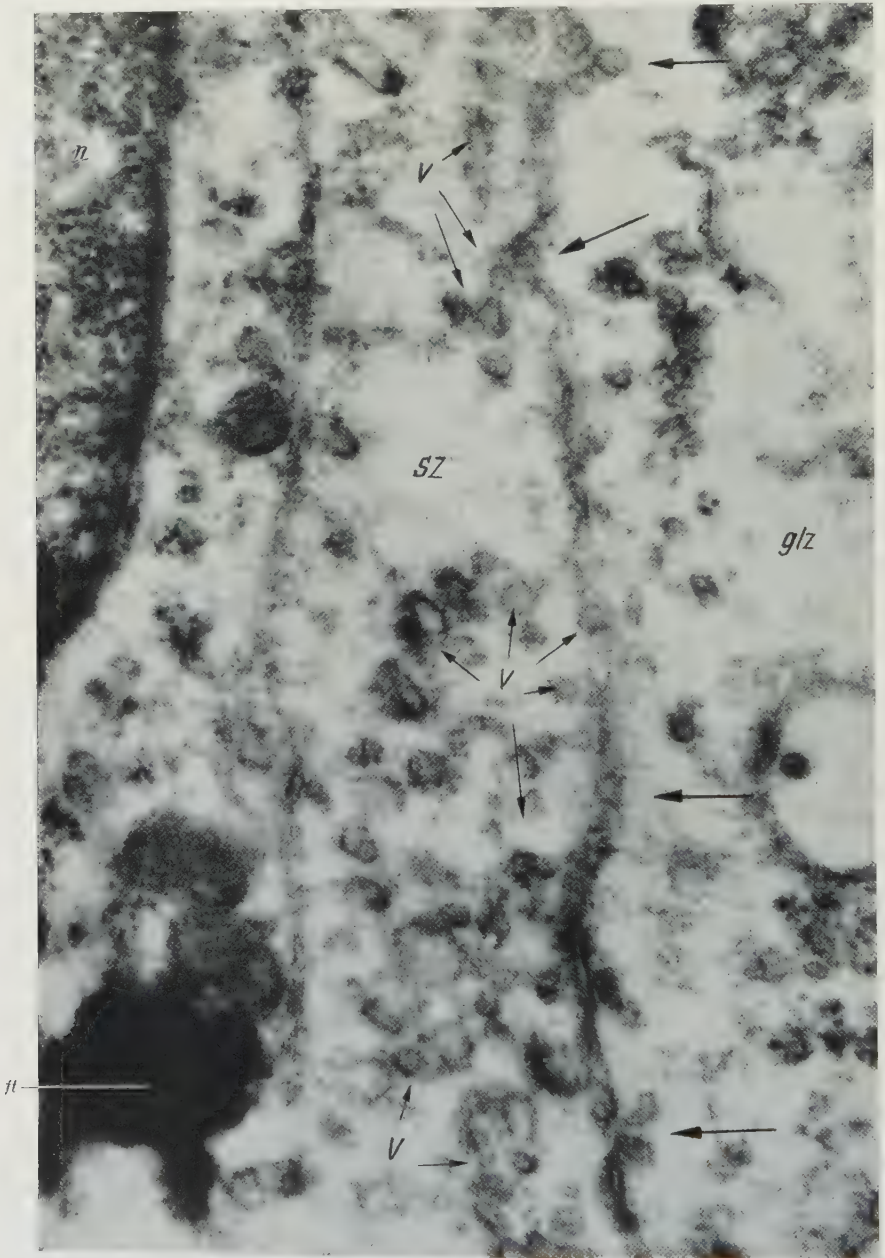


Abb. 9. Zellgrenze zwischen Satellit (sz) und Perikaryon (glz). Mehrere 500—600 Å große Vesikel (v) scheinen durch die Zellmembranen in das Perikaryon einzudringen (s. Pfeile), Satellitenkern (n), Fettropfen (ft). Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 50 000 ×

verlaufenden Nervenfasersfortsätze müßten so auch in morphologischer Hinsicht als ein zusammengehörendes System angesehen werden.

Regelmäßig trifft man in den Satellitenzellen *Pigmentkörnchen* an. Im Aufbau ähneln sie sehr den Lipofuscingranula der Ganglienzellen, jedoch erreichen sie im allgemeinen nicht die Größe jener Partikel.

Von diesen zu unterscheiden sind gelegentlich auftretende kleine Fetttröpfchen, die in größeren Exemplaren bereits von KUBOTA und HIOKI (1943) lichtmikroskopisch bemerkt wurden. Sie sind an ihrer membranlosen, mit tiefen Einbuchtungen versehenen Oberfläche und dem starken Kontrast zu erkennen (Abb. 9).

Die meist kleinen, kompakten *Mitochondrien* der Satelliten besitzen keine besonders ausgeprägte Cristae-Zeichnung. *Ergastoplasmatisches Retikulum* und Ribosomengruppen (RNS-Granula) sind relativ spärlich verbreitet. Besonders arm an diesen Ergastoplasmastrukturen ist die Satellitenhülle der kleinen „dunklen“ Zellen. Dagegen finden sich hier wesentlich mehr Querschnitte von Nervenzellfortsätzen als in den Mantelzellen der großen „hellen“ Perikarya (Abb. 5 und 14). Wie weit es sich hier um *Dendriten* anderer Nervenzellen oder um *paraphytäre Ausläufer* handelt, läßt sich noch nicht entscheiden.

Obwohl dieser auffallende Satellitenunterschied in fester Korrelation zu den Ganglienzelltypen zu stehen scheint, ist es im Einzelfall an Zellausschnitten nicht möglich, allein an der Strukturart des Hüllplasmas den zugehörigen Perikaryotyp zu bestimmen.

Die zahlreichen, mit Versilberungsmethoden darstellbaren *Gliozytenformen* (DEL RIO HORTEGA 1922, 1928, 1945, DE CASTRO 1951 und SCHARENBERG 1952, sowie HERZOG 1954) konnte ich elektronenmikroskopisch nicht erkennen. Allerdings bedürfen die verwickelten Zellgrenzverhältnisse der Satelliten, die durch Überlappung von Zellfortsätzen und innige Verzahnungen an Konus und Initialglomerulum entstehen, noch einer besonderen Analyse durch Rekonstruktionen aus Schnittserien.

Für „*Gliafasern*“, die den Neuriten spiralgig umgeben sollen (ORTIZ-PICON 1955), oder andere netz- oder schleierartig angeordnete *Gliozytenfibrillen* (SCHARENBERG 1952) fehlten entsprechende Strukturen im elektronenmikroskopischen Bild. Ebenfalls kamen innerhalb der Mantelzellen keine fibrillären Elemente zur Darstellung, wie sie KUBOTA und HIOKI (1943) nach Eisenhämatoxylinfärbung beschrieben haben.

3. Perikarya

a) Topographie und Gestalt. In den von mir untersuchten lumbalen Spinalganglien liegen die Perikarya vorzugsweise subkapsulär und bilden eine mehr oder weniger kompakte, die Zentralfasern umgebende *Mantelschicht*. Dieses Anordnungsprinzip stimmt nicht mit der Vorstellung von BÜHLER (1898) und SCHARF (1958) überein, daß bei Nagern die Masse der Perikarya in der Mitte des Ganglions zwischen den Nervenfasern liege. Sie entspricht vielmehr den Verhältnissen bei Carnivoren, die v. KÖLLIKER bereits 1850 dargestellt hat. Das phasenkontrastoptische Übersichtsbild demonstriert die dichte Packung der Ganglienzellen (Abb. 1). Stellenweise ist sie durch Kapillaren und Nervenfasern aufgelockert. Die meist sensiblen Ganglienzellen zeigen polygonale Schnittbilder, die ihrer *irregulär polyedrischen Gestalt* entsprechen. Mit anderen histologischen Methoden wurden schon früher „*multipolare*“ (KISS 1932), „*multanguläre*“ (BLAIR, BACSICH und DAVIS 1936) sowie „*polygonale*“ Zellen (SCHARF 1958) in Spinalganglien beobachtet und zum Teil als besondere Typen herausgestellt.

Allerdings beziehen sich diese Mitteilungen vorwiegend auf die sog. „kleinen dunklen“ Zellen, die erstmalig von KONEFF (1887) und DAAE (1888) beschrieben

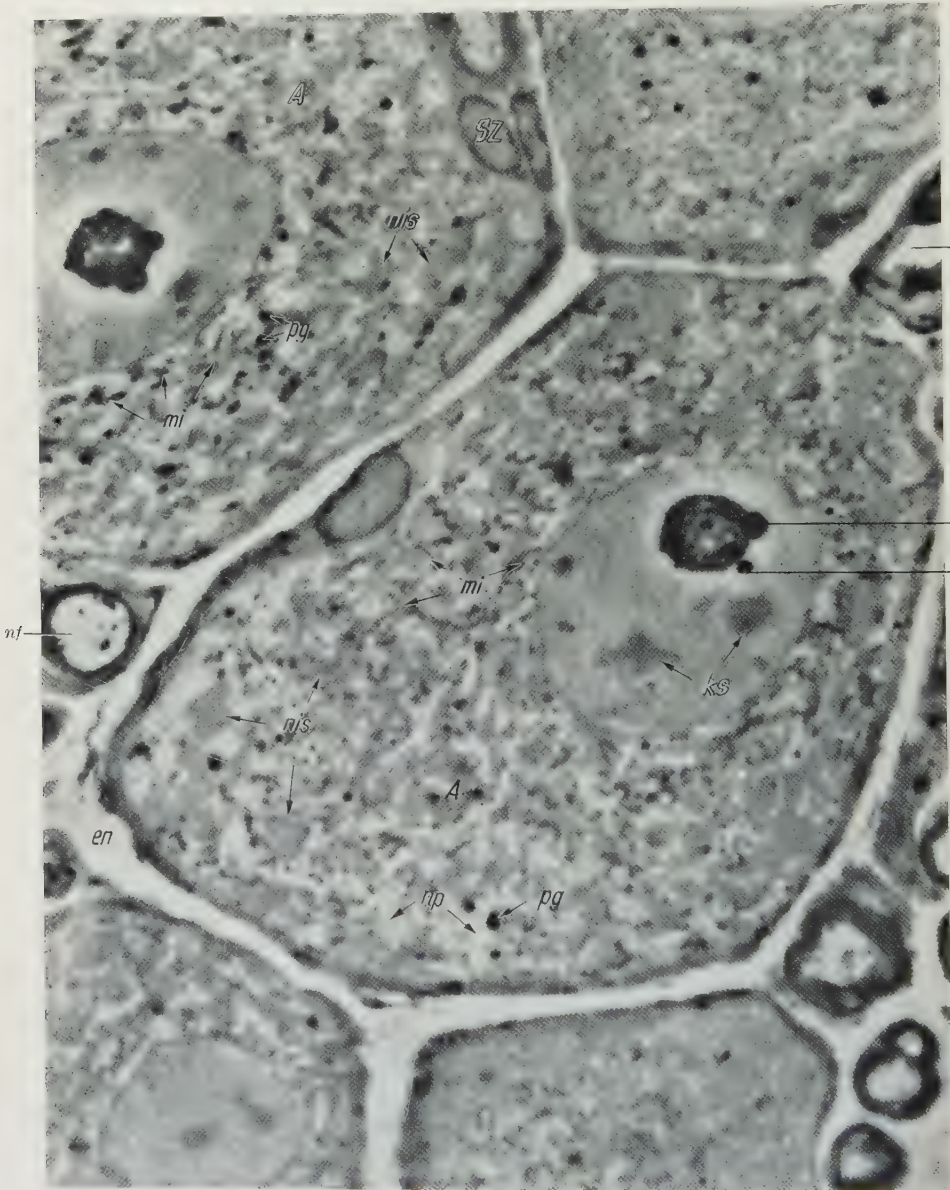


Abb. 10. Zwei „große helle Zellen“ (Perikaryotyp A₁) aus einem lumbalen Spinalganglion der Ratte. Polyedrische Zellform infolge der dichten Zellpackung. Nissl-Schollen (n/s), Neuroplasma (np), Mitochondrien (mi), Pigmentgranula (pg), Kernplasmascollen (ks), Nukleolus (nk), Nukleolarsatellit (nst), Satellitenhülle (sz), markhaltige Nervenfasern (nf), Endoneuralspalt (en), Kapillare (kp). Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 1700 ×

wurden. Auch in meinen Präparaten ist die Polyederform bei den kleinen, dicht strukturierten Ganglienzellen ausgeprägter als bei den „großen hellen“ Zellen

(Abb. 1). Trotzdem dürfte die Form der Perikarya in den Spinalganglien weniger eine Eigenschaft sui generis bestimmter Zelltypen sein, sondern sie ist wohl



Abb. 11. „Kleine dunkle Zellen“ (Perikaryotyp B₁) aus einem lumbalen Spinalganglion der Ratte. Die Nissl-Schollen (*nis*) heben sich vom kontrastreichen Neuroplasma (*np*) nur wenig ab, dagegen erscheint der Kern als relativ helle Blase. Kernplasmashollen (*ks*), Randschollenkranz der Nissl-Substanz (*rsk*), Mitochondrien (*mi*), Pigmentgranula (*pg*), Satellitensaum (*sz*), Kapillare (*kp*).

Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 2000 ×

zumeist durch die jeweilige topographische Situation bedingt. Gelegentlich scheinen große, helle Ganglienzellen auf Grund einer besonderen Festigkeit oder

eines erhöhten Turgors ihres Plasmas jener durch die Zellpackung hervorgerufenen Formung zu widerstehen. Im Schnittbild haben solche Perikarya dann mehr runde oder ovale Umrisse (Abb. 1).

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Spinalganglien bezeichneten HOSSACK und WYBURN (1954) die großen, hellen Perikarya als *Typ A* und die kleinen, dichten als *Typ B*. Diese Typeneinteilung wurde von DAWSON, HOSSACK und WYBURN (1955) für Zellen im Kaninchenspinalganglion und von HESS (1955) für sensible Perikarya vom Meerschweinchen übernommen.

In den lumbalen Spinalganglien von Ratten lassen sich bereits mit dem von mir angewandten Phasenkontrastverfahren ebenfalls große Perikarya mit auffallender Nissl-Schollenzeichnung und hellem Neuroplasma (Typ A) (Abb. 1 und 10) von kleineren Zellen unterscheiden, die ein dichtes, bei der Übersichtsvergrößerung fast homogen strukturiertes Zytoplasma haben, in dem sich der Kern als helle Blase abhebt (Typ B) (Abb. 1 und 11).

Nach grobstatistischer Auswertung scheinen in den lumbalen Ganglien beide Zelltypen etwa in gleicher Anzahl vorhanden zu sein, allerdings dominiert der Typ A infolge seines wesentlich größeren Volumens. Die *topographische Verteilung* der Zelltypen ist nicht immer gleichmäßig. Perikarya vom Typ B liegen gern zu kleinen und größeren Gruppen gehäuft. Die nähere Untersuchung der einzelnen Perikarya ergibt, daß die nach den Typenbezeichnungen A und B differenzierten Perikarya auch untereinander im Zellaufbau nicht einheitlich sind, sondern sich noch in je drei Zellformen unterteilen lassen (s. Abschnitt III, 3d). Hierbei muß als ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal die *Perikaryagröße* berücksichtigt werden. Sie schwankt in der Typengruppe A zwischen 30 und 75 μ . Die Mehrzahl der „A-Zellen“ hat jedoch Ausmaße von 40—55 μ . Die „B-Zellen“ sind in der Regel 20—35 μ groß, man trifft aber unter ihnen nicht selten auch kleinere und größere Elemente, die in Ausnahmen minimal 15 und maximal 40 μ messen können.

Das *Initialglomerulum* der A-Perikarya ist oft so ausgedehnt, daß Teile von ihm in fast jeder Schnittebene der Zelle zur Darstellung kommen. Der zunächst noch nicht von einer Markscheide umgebene Neurit ist in Längs- und Querschnitten an dem hellen Axoplasma zu erkennen (Abb. 1 und 12). Sein Durchmesser schwankt in der Regel zwischen 4 und 6 μ , aber auch Werte von 10 μ kommen zuweilen vor. Die kleinen Exemplare der A-Zellen (Typ A₃) haben nur markarme Neuriten von 2—3 μ Dicke. Ihr Initialglomerulum ist weniger deutlich ausgebildet. Es liegt meist in einer schmalen Zone dicht an die Zelloberfläche gedrückt.

Die Nervenzellfortsätze der Perikarya der Typengruppe B sind dünn, marklos oder sehr markarm (Abb. 16). Der Ursprungskegel wird infolge seiner geringen Ausdehnung in diesen Zellen nur selten im Schnitt getroffen. Teilweise scheinen die Perikarya dieses Typs gar keinen Konus zu besitzen (Typ B₂ und B₃). Auch ein Initialglomerulum konnte ich mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode an den Ganglienzellen vom Typ B nicht mit Sicherheit erkennen.

b) **Zytoplasma.** In der Phasenkontrastübersicht wird das Zytoplasma der großen, hellen Zellen von homogen grau erscheinenden Schollen beherrscht, die seit der Arbeit über die „Feinstruktur der Nervenzellen“ von PALAY und PALADE (1955) mit Sicherheit als *Nissl-Substanz* identifiziert werden dürfen. Das *Neuro-*

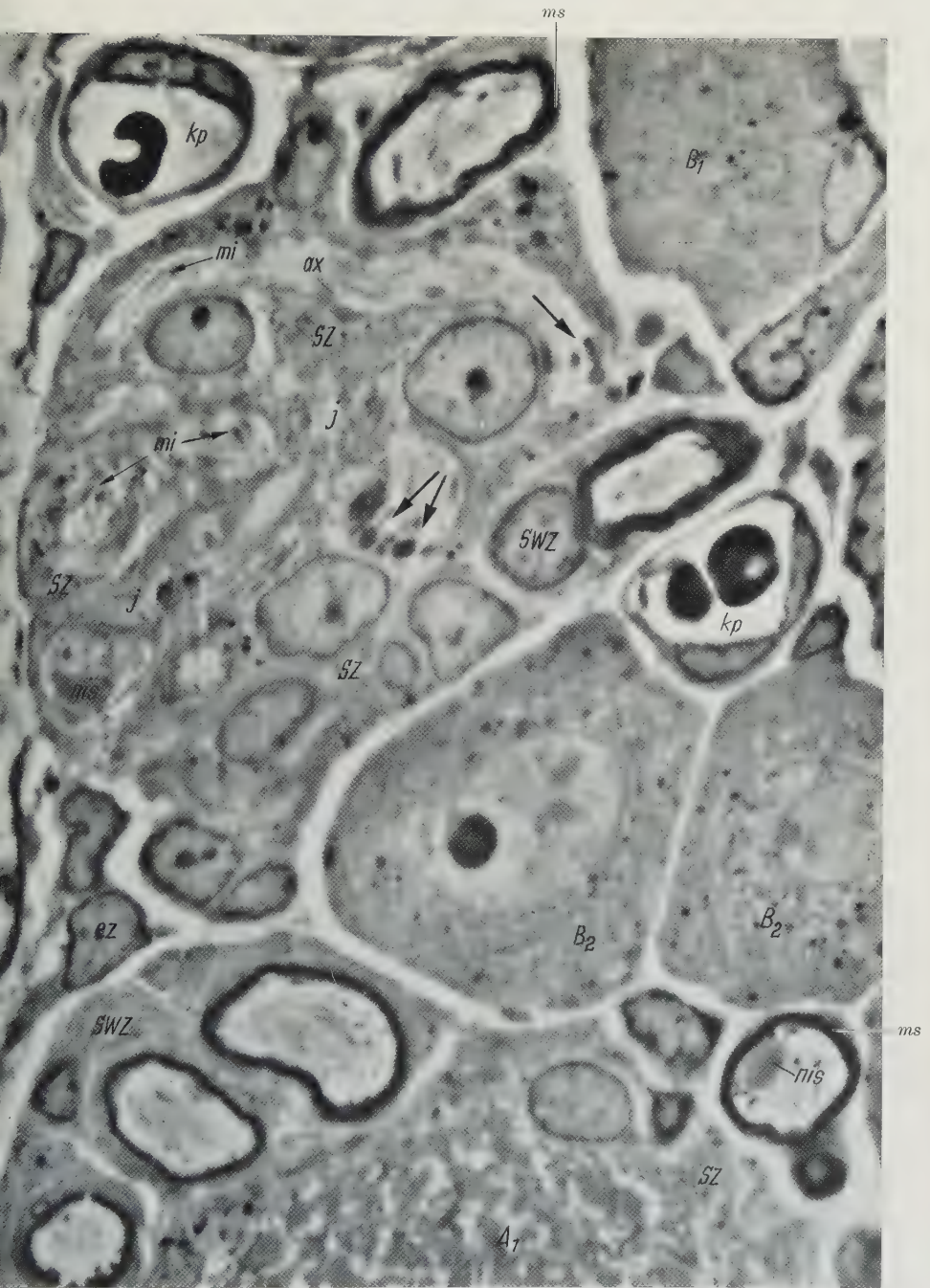


Abb. 12. Initialglomerulum (j) einer Ganglienzelle vom Typ A_1 aus einem Spinalganglion der Ratte. Der zunächst noch nicht myelinisierte Neurit hebt sich durch sein helles Axoplasma (ax) von den Hüllzellen (sz) ab. Die Axoplasmazeichnung wird durch eingelagerte Mitochondrien (mi) betont. An einzelnen Stellen sind die Mitochondrien stark vergrößert (s. große Pfeile). Nissl-Schollen in perikaryonnahen Neuritenabschnitten (nis), Markscheiden (ms), Kapillaren (kp), Endoneurialzelle (ez), Schwannsche Scheidenzelle (swz), verschiedene Perikaryatypen (A_1 , B_2 und B_1).

Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 1800 ×

plasma (Grundplasma), das die Nissl-Schollen durchdringt und umgibt, besitzt in den Perikarya vom Typ A wenig Kontrast. Teilweise erscheint es fast optisch leer.

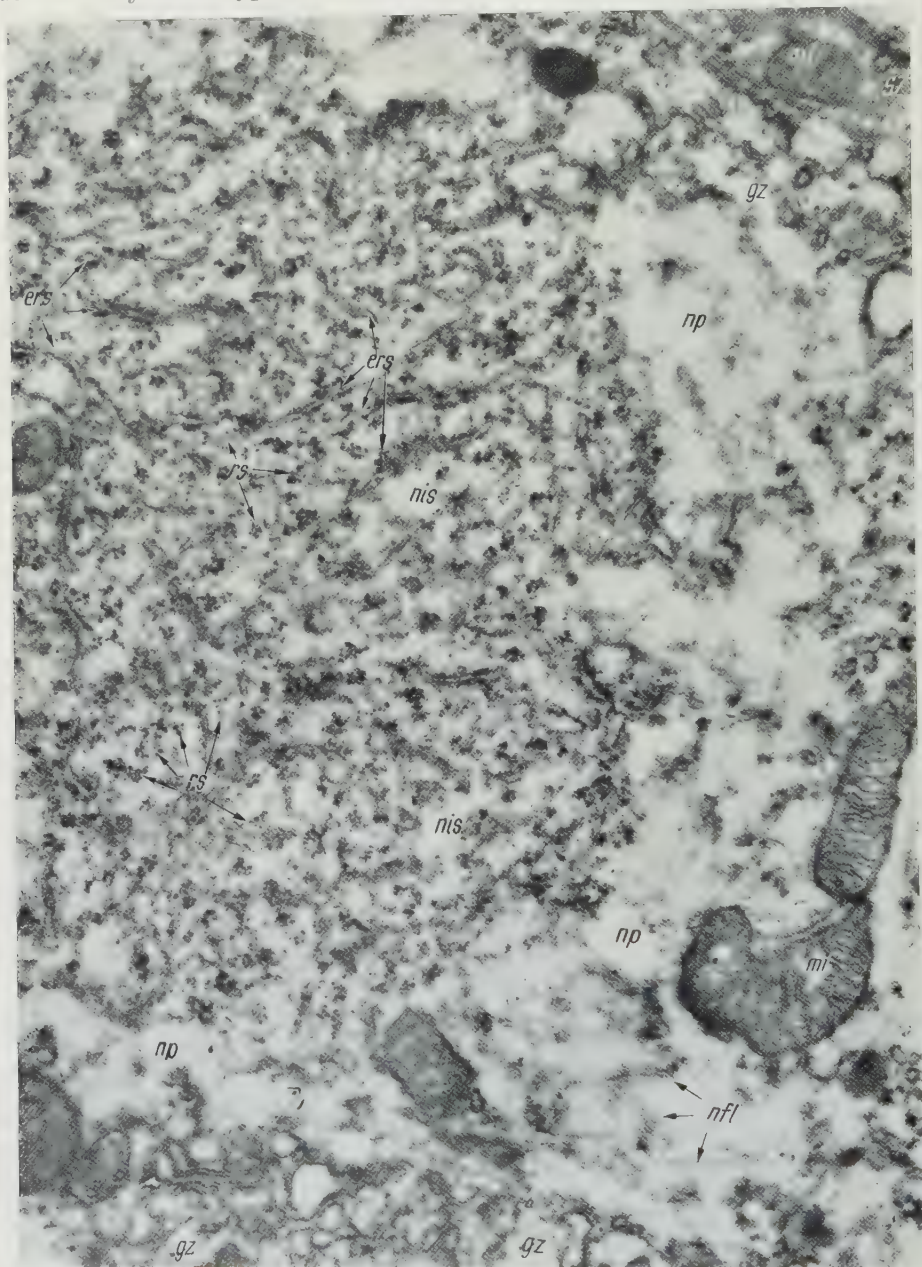


Abb. 13. Zytoplasma-Ausschnitt eines Perikaryons vom Typ A aus einem Ratten-Spinalganglion. Die Nissl-Scholle (*nis*) ist von einem kontrastarmen Neuroplasmasaum (*np*) umgeben. Neurofilamente (*nfl*), Mitochondrien (*mi*), Golgi-Zone (*gz*), Ergastoplasmaspalten (*ers*), Ribosomen (*rs*), Satellitenzelle (*sz*). Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 30 000 \times

Die Tigroidkörper haben einen unregelmäßig gezackten Rand. Ihre Größe ist nicht genau zu bestimmen, da die einzelnen Schollen ineinander übergehen

und durch Brücken verbunden sind. Auf diese Weise bildet die Nissl-Substanz zum Teil ein dreidimensionales Gitter. Eine genaue Analyse dieser Verhältnisse

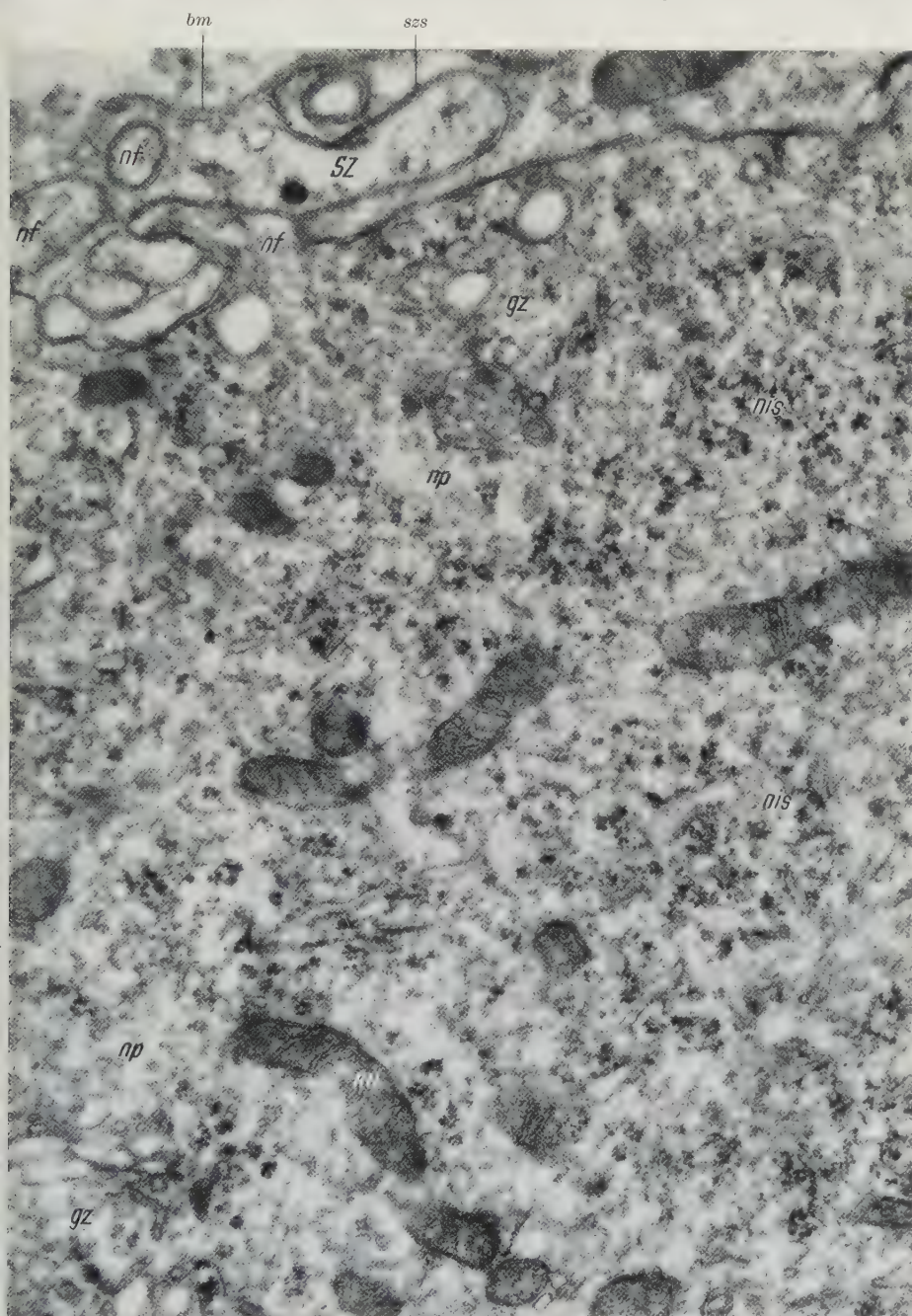


Abb. 14. Zytoplasma-Ausschnitt eines Perikaryons vom Typ B. Die Nissl-Substanz (*niss*) ist weniger scharf gegen das kontrastreiche Neuroplasma (*np*) abgegrenzt. Die Mitochondrien (*mi*) sind klein und dicht strukturiert. In der Satellitenhülle (*sz*) liegen Querschnitte von Nervenzellfortsätzen (*nf*). Satellitenzellgrenze (*szs*), Basalmembran (*bm*), Golgi-Zone (*gz*). Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 30 000 ×

wird erst durch räumliche Rekonstruktion möglich werden. In den Querschnitten betragen die Abmessungen der Schollen im Mittel 3—6 μ , stellenweise auch nur 2 μ und weniger (Abb. 10).

Die Nissl-Körper erfüllen, abgesehen vom Ursprungskegel die Perikarya in ziemlich gleichförmiger Verteilung. Größere Schollen liegen vorzugsweise in der Peripherie. Dies ist besonders bei den Ganglienzellen vom Typ B der Fall. In diesen Zellen sieht man auch unter normalen Verhältnissen sog. *Randschollenkranzbildungen* oder eine mehr diffuse Verteilung des Tigroids. So ist in den kleinen Spinalganglienzellen die Nissl-Schollenzeichnung weniger ausgeprägt. Allerdings wird ihr homogenes Erscheinungsbild im Phasenkontrastmikroskop nicht zuletzt auch durch das besonders dicht strukturierte Neuroplasma bestimmt.

Elektronenmikroskopisch stellt die Nissl-Substanz ein *endoplasmatisches Retikulum* dar (PALAY und PALADE 1953/55, DE ROBERTIS 1954a, DAWSON, HOSACK und WYBURN 1955, HESS 1955). In den Maschen des Netzwerkes liegen — zu kleinen Gruppen und Rosetten gehäuft oder auf den Membranen der *Ergastoplasmaspalten* kondensiert — die bekannten, 150—200 Å großen „*Ribosomen*“ (RNS-Granula, Palade-Granula) (Abb. 13). Nach der von mir angewandten Uranylazetatkontrastierung besitzen die Granula häufig eine kontrastreichere, meist nicht zirkulär geschlossene Außenzone. Dieselbe Feinstruktur wurde schon an Ribosomen in quergestreiften Muskelfasern festgestellt (PALADE 1955).

Die Ergastoplasmaspalten der Nissl-Schollen sind in meinen Präparaten nur zum Teil so ideal parallel orientiert, wie es PALAY und PALADE (1955) in einem Modell dargestellt haben. Möglicherweise werden solche Unterschiede durch die Art des Narkoseverfahrens hervorgerufen. Gelegentlich auftretende *zisternenartige Erweiterungen* der Spalten dürfen nicht mit einer generellen Aufblähung des Retikulums verwechselt werden, die an Ganglienzellen sehr leicht durch artifiziell ausgelöste patho- oder nekrobiotische Vorgänge entsteht (ANDRES 1961a).

Das *Neuroplasma* in den Ganglienzellen durchdringt und umgibt Nissl-Schollen und Golgiapparat. Abgesehen von der Verteilungsart des Tigroids bedingt es den Gesamtkontrast der Zellen. In den Perikarya vom Typ A ist es sehr hell und gibt den „*Plasmastraßen*“ zwischen den Nissl-Schollen, sowie dem Ursprungskegel und dem Axoplasma das fast optisch leere Aussehen. So erscheinen deshalb auch Zellen vom Typ A mit besonders breiten „*Plasmastraßen*“ auffallend blaß. Die Ausdehnung der hellen Plasmazonen zwischen den Tigroidkörpern steht offenbar zur Größe des dazugehörigen Neuriten in enger Beziehung. Dementsprechend haben die Ganglienzellen vom Typ B mit ihren dünnen, markarmen Zellausläufern eine kaum ausgeprägte „*Plasmastraßen*“-Zeichnung. Allerdings wird, wie bereits erwähnt, in diesen Zellen das mehr geschlossene Gesamtbild in erster Linie durch den wesentlich intensiveren Neuroplasma-kontrast hervorgerufen (Abb. 14).

Eine nisslschollenfreie *Ektoplasmazone*, wie sie von älteren Autoren (FLEMING 1882, E. MÜLLER 1891) an sensiblen Ganglienzellen beschrieben wurde, konnte ich in meinem Material nicht beobachten. Sie kann allerdings durch einen seitlich gelegenen, abgeflachten Konusabschnitt vorgetäuscht werden.

Die vorherrschende Struktur im Nervenzellgrundplasma sind die netzartig oder parallel orientiert verlaufenden *Neurofilamente*, die FERNÁNDEZ-MORÁN

(1952/54) erstmalig im Achsenzylinder von Nervenfasern dargestellt hat. Diese Filamente, die das submikroskopische Substrat der versilberbaren *Neurofibrillen* sind, haben in Spinalganglienzellen nach Untersuchungen von PALAY und PALADE (1955) und nach eigenen Messungen einen Querdurchmesser von 70–100 Å (Abb. 10). Der Ursprung der Filamente scheint in verdichteten Neuroplasma-zonen am Rand der Nissl-Schollen zu liegen. Im Innern der Tigroidkörper treten Neurofilamente nicht auf.

Weniger deutlich lassen sich Neurofilamente in den Zellen der B-Gruppe erkennen. Vielleicht werden sie hier zum Teil von dem kontrastreichen Neuroplasma überdeckt (Abb. 14).

Im *Ursprungskegel* findet man, außer den sich zu einem Bündel formierenden Neurofilamenten und zahlreichen Mitochondrien, kleine, 250–600 Å messende Vesikel, die wahrscheinlich dem Golgi-Apparat entstammen. Sie sind nicht besonders zahlreich und liegen in unregelmäßiger Anordnung. Die Formelemente des Konus beherrschen dann auch im *Axoplasma* des Nervenzellfortsatzes das Bild. Recht häufig finden sich im noch nicht myelinisierten Anfangsteil des Neuriten großer Perikarya dichte Gruppen von relativ großen (bis $1,5\ \mu$) Mitochondrien (Abb. 12). Hin und wieder traf ich im *Crus commune* noch kleinere Reste von Nissl-Schollen an, die im Konus der Ganglienzellen der Gruppe A vereinzelt, aber regelmäßig auftreten.

Dieser zuletzt erwähnte Befund scheint die Anschauung, daß das *Crus commune* einen dünnen, ausgezogenen Teil des Ganglienzellkörpers darstelle (HIS 1887, RAMON Y CAJAL 1893, HEIDENHAIN 1911), zu bestätigen. So konnte ich in diesem Schenkel auch keine, durch eine besondere Anordnung oder eine Membran getrennten „afferenten“ und „efferenten“ Fibrillenbündel feststellen.

In den markhaltigen Nervenfasern großer Perikarya konnte ich ein auffallend starkes *Axolemm* beobachten (Abb. 15). Darüber hinaus stimmten meine Befunde über die Ultrastruktur der *marklosen* und *markhaltigen Nervenfasern* mit denen zahlreicher anderer Autoren (FERNÁNDEZ-MORÁN 1952, 1954, DE ROBERTIS 1954b, HESS und LANSING 1953, HONJIN 1955, GASSER 1955, ROBERTSON 1955, ELFVIN 1958) vollkommen überein, so daß von einer näheren Beschreibung abgesehen werden kann.

Über die topographische Anordnung und Größe der *Mitochondrien* in den Perikarya gibt, wie ich schon an einigen Beispielen zeigen konnte, das Phasenkontrastbild einen gewissen Aufschluß. In den Zellen vom Typ A liegen sie ziemlich gleichmäßig in den hellen „Plasmastraßen“ zwischen den Tigroidkörpern und Golgi-Komplexen verteilt. Dagegen ist das Chondriom des B-Typs gerne in Kernnähe konzentriert.

Die Form und Größe der Mitochondrien in den Ganglienzellen ist sehr variabel. Sie treten als runde, bis zu $0,5 \times 2\ \mu$ große Partikel neben gestreckten, 4–5 μ langen, aber nur 0,15–0,25 μ dicken Fäden auf. Auch kleinere rundliche oder stäbchenartige Schnittbilder mit einem Durchmesser von 0,2–0,3 μ kommen häufig vor, die wohl nicht immer quergetroffene Fäden, sondern auch kleine runde Formen darstellen. In der Regel trifft man große Mitochondrien nur in den großen, hellen Perikarya an, während die B-Zellen meist kleine, dicht strukturierte Mitochondrien enthalten. In den letzteren ist die Lamellenzeichnung weniger gut ausgeprägt.

Die *Matrix* zwischen den *Cristae mitochondriales* zeigt nach Uranylazetat-kontrastierung eine äußerst feine Granulierung. Vereinzelt auftretende, bis zu 400 Å große, sehr elektronendichte Körnchen wurden nur in Mitochondrien der Perikarya vom Typ A gesehen. Solche kontrastreichen Granula haben bereits unter anderem SJÖSTRAND und RHODIN (1953) in Mitochondrien von Nierentubulusepithelien und SJÖSTRAND und HANZON (1954) in Mitochondrien von Pankreasazinuszellen beobachtet.

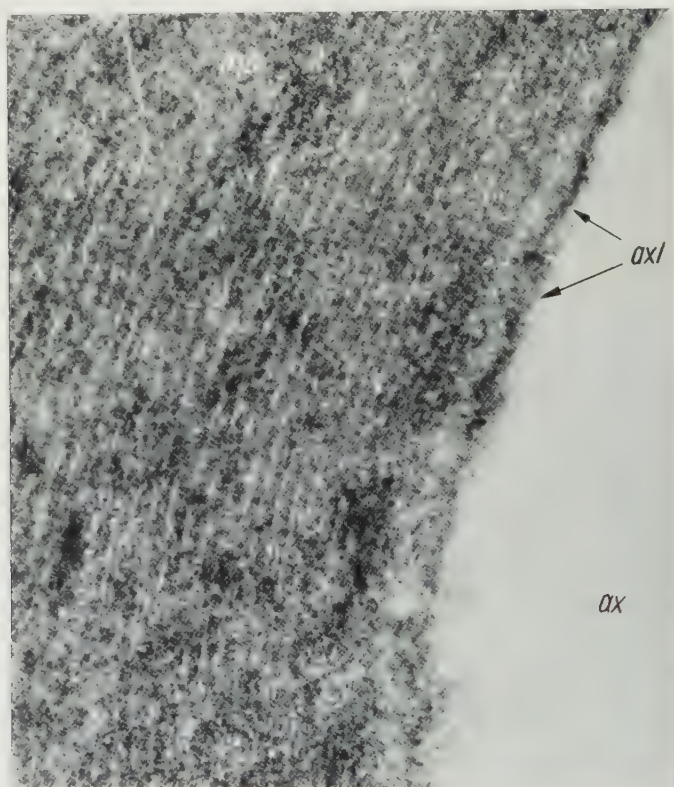


Abb. 15. Ausschnitt aus einer Markscheide (*ms*) perikaryonnah mit besonders ausgeprägtem Axolemm (*axl*). Die kontrastarmen Neurofilamente des Axoplasma (*ax*) sind nicht dargestellt.
Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 130 000 ×

Die von DALTON und FELIX (1956) als *Golgiapparat* identifizierten retikulären Zytoplasmastrukturen bilden in den Spinalganglienzellen meist ein Konglomerat aus 300—1000 Å großen Bläschen oder Querschnitten von verzweigten Kanälchen. Einige, meist zentral im Golgi-Komplex liegende Vesikel sind bis zu 400 m μ weit. *Lamelläre Membranschichtung*, die in anderen Zellen für dieses Organell typisch ist, konnte ich in den Perikarya verhältnismäßig selten sehen. Die Ausdehnung des Golgiapparates läßt sich in den A-Zellen von der Kernmembran bis dicht unter die Oberfläche verfolgen. Dagegen findet man seine Anteile in den B-Zellen in der Hauptsache um den Kern gruppiert. Die 0,5—1,5 μ großen Komplexe können durchaus Querschnitte eines dreidimensionalen Raumgitters sein, wie

RAMON Y CAJAL (1914) den „apparato reticolare interno“ in normalen Ganglienzellen dargestellt hat.

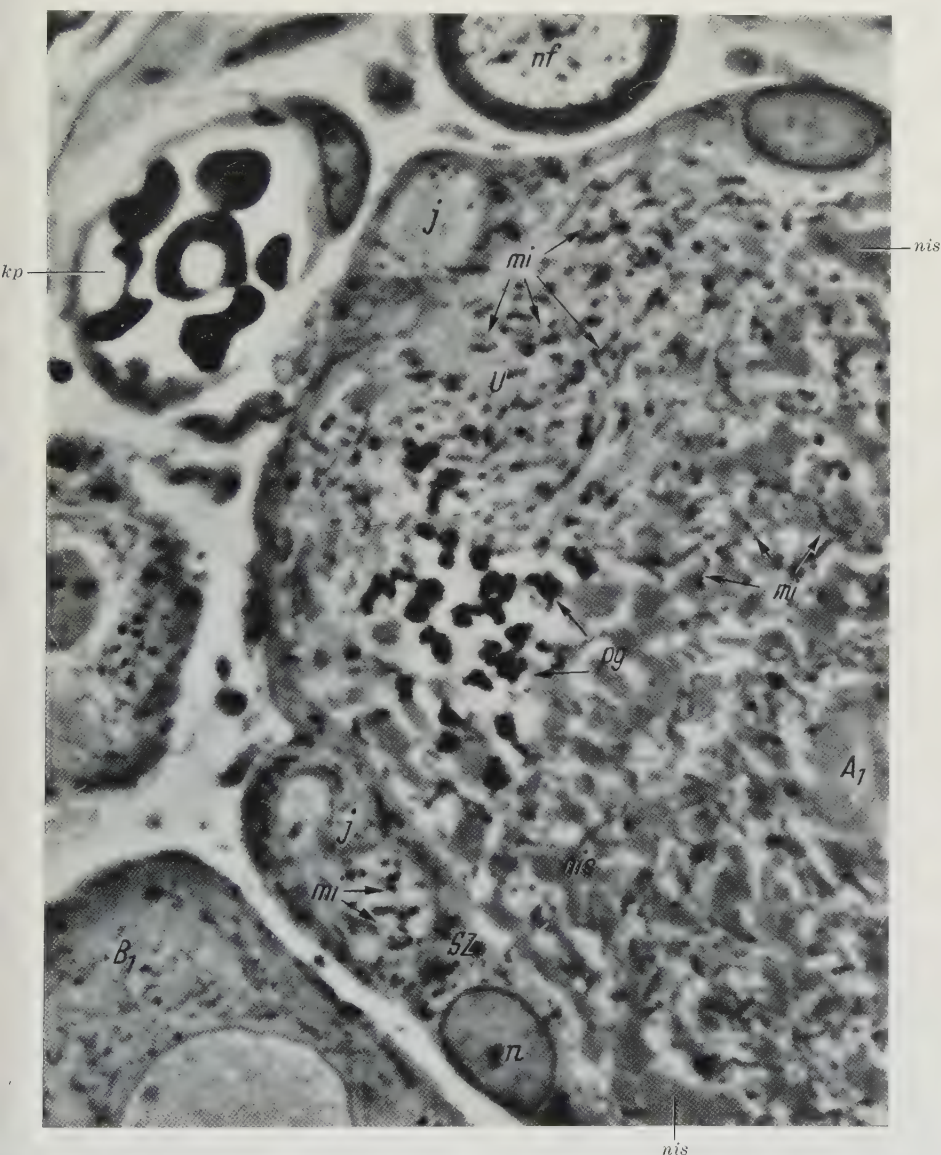


Abb. 16. Ursprungskegel (*u*) eines Perikaryons vom Typ A_1 . Noch nicht myelinisierte Abschnitte des Initialglomerulums (*j*), Mitochondrien (*mi*), große markhaltige Nervenfasern (*nf*), Satellitenzelle (*sz*) mit Kern (*n*). Kleines markloses Nervenfaserbündel (*nf*), Abschnitt eines Perikaryons vom Typ B_1 , weite Kapillaren mit Erythrozyten (*kp*), Ansammlung von Lipofuscingranula (*pg*).

Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 2000 \times

Gegenüber den bisher besprochenen geformten Zytoplasmabestandteilen fallen die 0,2—1,5 μ großen *osmiophilen Granula* durch ihren besonders hohen Kontrast auf. Ihre Verteilung innerhalb der Zelle ist deshalb auch im Phasenkontrastmikroskop deutlich zu erkennen. In den A-Zellen findet man häufig eine größere

Ansammlung neben dem Ursprungskegel (Abb. 16), während die Körnchen in den kleineren Zellen zumeist unregelmäßig verteilt liegen.

Elektronenmikroskopisch ist zu erkennen, daß die einzelne Partikel von einer etwa 100 Å dicken Membran umgeben ist; ihre Gestalt erscheint rund oder knollenartig deformiert. Gelegentlich sind mehrere Körnchen miteinander ver-

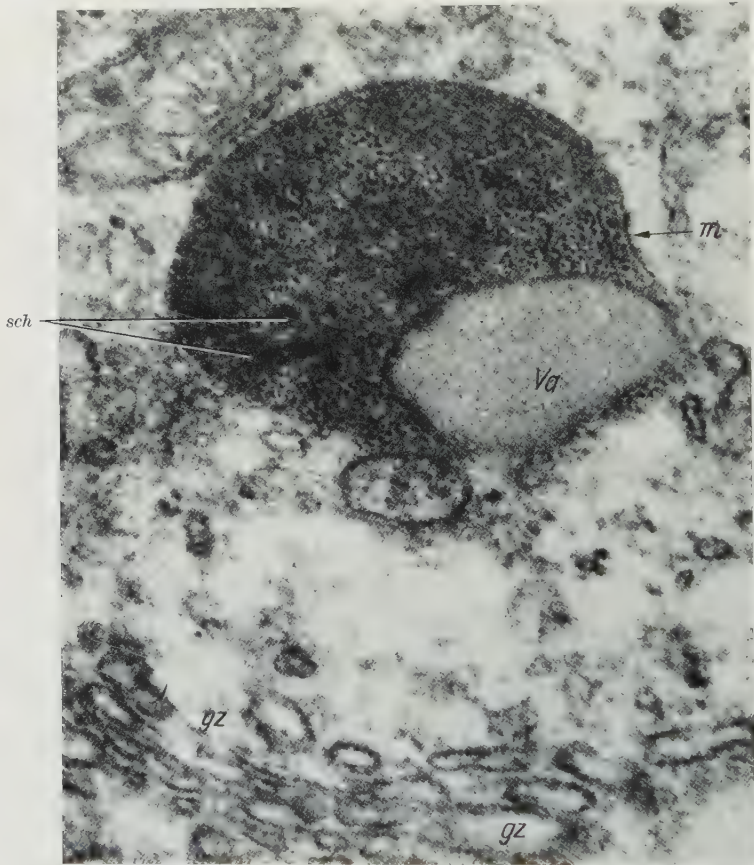


Abb. 17a. Lipofuscin-Körnchen, granulärer Typ aus einem Perikaryon vom Typ A. Umgebende Membran (m), Schollen (sch), opake Vakuole (va), im Bild unten Anschnitt einer Golgi-Zone (gz)

backen. Die Innenstruktur ist fein granulär, größere Elemente enthalten daneben regelmäßig noch dichte Schollen und exzentrisch unter der Membran gelegene opake Vakuolen (Abb. 17a), deren Durchmesser nicht selten mehr als $0,4 \mu$ betragen. Damit stimmen die osmiophilen Körnchen in der Feinstruktur mit den von LINDNER (1957) beschriebenen *Lipofuscingranula* des Herzmuskels überein.

Neben diesen Granula konnte ich noch andere Partikel beobachten, die ebenfalls zum Teil exzentrische Vakuolen zeigen, sich aber vor allem durch eine lamellenartige Innenstruktur auszeichnen (Abb. 17b). Die Breite der Schichtenperiode wechselt zwischen 125 und 200 Å. Diese Körnchen, die ausschließlich in den Perikarya vom Typ B auftreten, sind wahrscheinlich ebenfalls den Lipofuscingranula zuzuordnen. BJÖRKERUD und ZELANDER (1960) fanden einen

myelinähnlichen Feinbau im „gelben Pigment“ des menschlichen Rückenmarks. Diese beiden morphologisch identischen Befunde über Pigmentstrukturen darf man jedoch nur mit großer Zurückhaltung vergleichen, da sich bei der von den schwedischen Autoren angewandten Körnchenisolierung möglicherweise artifizielle Myelinschichten gebildet haben.

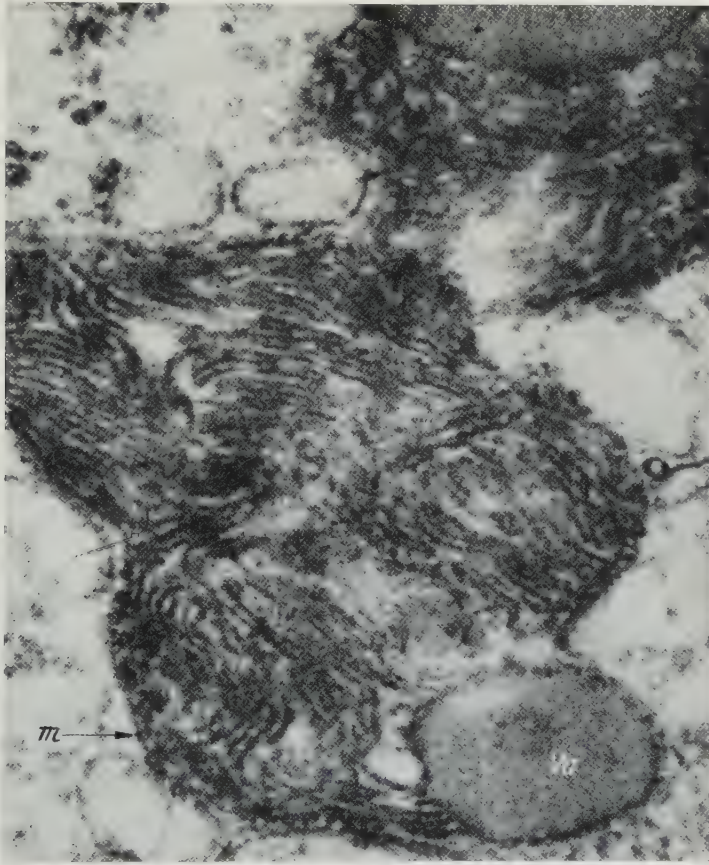


Abb. 17 b. Lipofuscin-Körnchen, lammellärer Typ aus einem Perikaryon vom Typ B. Bezeichnungen wie in Abb. 17 a. Elektroneumikroskopische Aufnahmen, Vergr. 87 000 ×

c) Zellkern. Die *Kernform* der A-Zellen ist ovoid oder gestreckt oval, seltener richtig rund. Die *Oberfläche* zeigt im Schnitt eine unregelmäßig *gewellte Kontur*. Im Phasenkontrastbild ist die Kernmembran deshalb nicht gleichmäßig deutlich, da sie selbst im Äquatorialschnitt zum Teil schräg und tangential getroffen werden kann. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um ein *in vivo* vorhandenes Funktionsbild, da die mehr runden Kerne der kleinen Ganglienzellen bei gleicher Präparation und Fixierung zumeist *glatte Oberflächen* zeigen, die nur gelegentlich mit zirkumskripten Eindellungen versehen sind. Ihre Membran erscheint im Phasenkontrastmikroskop als scharfe Linie.

Die *Kerngröße* entspricht in meinen Präparaten etwa den Angaben älterer Autoren (BÜHLER 1898, KÖRNER 1937 a). Die großen Durchmesser der Ganglien-

zellkerne liegen zwischen 12 und 22 μ . Ausnahmsweise wurden bei entsprechender Ganglienzellgröße etwa 8 μ kleine, bzw. bis zu 25 μ große Kerne gemessen.

Die topographische Lage des Kernes in der Zelle ist selten genau zentral, doch hält er in der Regel von der Zellmembran und vom Ursprungskegel eine Distanz

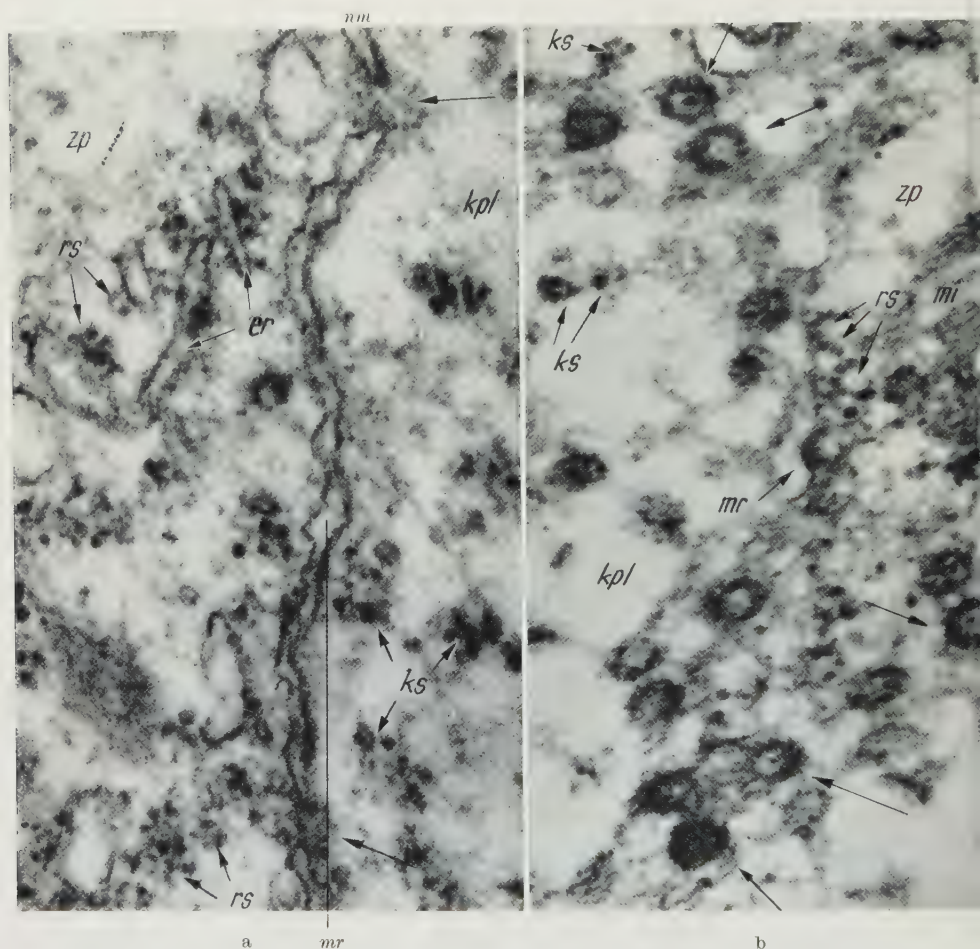


Abb. 18. a Querschnitt der Kernmembran (nm) in einem Perikaryon vom Typ A aus einem Ratten-Spinalganglion. Infolge des welligen Verlaufes der beiden Membranlamellen ist die Weite des Membranspaltraumes (mr) unterschiedlich groß. Zytoplasma (zp), Ribosomen (rs), endoplasmatisches Retikulum (er), Kernplasma (kpl), Karyosomen (Chromatingranula) (ks). Die großen Pfeile markieren Kernmembranporen (np), in deren Bereich besonders fein granuliertes Material liegt. b Tangentialschnitt einer gewellten Kernmembran desselben Zelltyps. Die aus dem feingranulären Material gebildeten Porenringe umschließen häufig ein in der Lichtung liegendes Körnchen.

Bezeichnungen wie in Abb. 18a. Elektronenmikroskopische Aufnahmen, Vergr. 70000 \times

von mindestens 5—7 μ ein. Zweikernige Zellen, wie ich sie im Ganglion cervicale craniale vom Kaninchen elektronenmikroskopisch bestätigen konnte, kommen in Rattenspinalganglien normalerweise nicht vor.

Die Kernmembran bildet elektronenoptisch die von HARTMANN (1952) und BRETSCHNEIDER (1952) entdeckte Doppellinie. Sie wurde in der grundlegenden Arbeit von WATSON (1955) als ein von Membranen ausgekleideter „Plasma“-

Spaltraum analysiert. WATSON wies an mehreren Beispielen nach, daß dieser Spaltraum mit dem endoplasmatischen Retikulum kommunizieren kann. Diese Verhältnisse konnte ich auch für den Spinalganglienzellkern bestätigen. Bei den großen Perikarya (Typ A) zeigen die beiden Membranen des in sich schon gewellten Kernhäutchens im Querschnitt oft einen unregelmäßigen Verlauf, so daß der Spalraum zwischen ihnen wechselnd 100—250 Å breit ist. Gelegentlich kommen zirkumskripte Erweiterungen bis zu 500 Å vor (Abb. 18a). Dagegen liegen die Membranen in Typ B, der glatten Oberfläche entsprechend, parallel zueinander und haben einen Abstand von etwa 120 Å. Die dem Karyoplasma zugewandte, innere Membran ist mit 100—120 Å meist 30—50 Å dicker als die äußere. Verbindungen des Kernmembran-Spaltraums zum endoplasmatischen Retikulum sind in Zellen vom Typ B äußerst selten.

Ein regelmäßig in den Häutchen des Interphasenkerns vorkommendes Bauelement sind die zuerst von BRETSCHNEIDER (1952) beschriebenen *Kernporen*. Sie wurden von anderen Autoren mit verfeinerten Methoden genauer untersucht (BAHR und BEERMANN 1954, WATSON 1955, DAWSON u. Mitarb. 1955, AFZELIUS 1955, 1957 und WATSON 1959).

An Nervenzellkernen konnte DE ROBERTIS diese von einer ringartigen, dichter strukturierten Zone umgebenen Gebilde bereits 1954 darstellen. Die Öffnungsweite der Poren schwankt je nach Zellart zwischen 300 und 700 Å (WATSON 1955).

Für Spinalganglienzellen soll sie nach DAWSON u. Mitarb. 850 Å ausmachen. In meinen Präparaten ist die Lichtung allerdings nur 400—500 Å weit (Abb. 18a und b). Der äußere Durchmesser des umgebenden *Ringmantels* beträgt 1000 bis 1100 Å. Diese Maße entsprechen auch denen der morphologisch identischen Ringe in den „*annulated lamellae*“ aus dem endoplasmatischen Retikulum der Endoneuralzellen (vgl. Abb. 3).

Der Abstand der Poren untereinander ist auf der Oberfläche der Ganglienzellkerne nicht so dicht und regelmäßig, wie er z. B. von AFZELIUS (1957) für das Seeigellei beschrieben wurde. Die Porenringe können sich stellenweise fast berühren, andererseits auch mehr als 1000 Å voneinander getrennt sein. Pro Flächeneinheit scheinen die Kernmembranen der Perikarya von Typ B weniger Poren zu enthalten, als die der großen, hellen Zellen.

Die Struktur des *Kernplasmas* ist im phasenkontrastoptischen Bild fast homogen grau oder angedeutet feinflockig. Eine stärkere Granulierung wäre hier ein sicheres Zeichen für Artefaktbildungen oder nekrobiotische Veränderungen (ANDRES 1961a). Regelmäßig trifft man jedoch auf einige rundliche, polygonal oder irregulär gestaltete, 0,3—5 μ große *Schollen* (Abb. 10 und 11).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Kernplasmas ergeben recht einförmige Strukturen. PORTER (1954), WATSON (1955) und DE ROBERTIS (1956) stellten als dominierendes Bauelement mehr oder weniger gleichmäßig verteilte, etwa 100—350 Å große *Granula* fest, die morphologisch den „Palade-Körnchen“ des Zytoplasmas gleichen. DE ROBERTIS (1956) zeigt darüber hinaus in Schnittbildern von Mitosestadien neben den Granula ineinander verschlungene *Filamente* mit einem Durchmesser von 18—84 Å, die er den Chromosomen zuordnet. Für den Interphasenkern weisen HORSTMANN und KNOOP (1957) 20—30 Å dicke Filamente im Karyoplasma nach. Die einzelnen Fibrillen sind teilweise zu Fäden mit einem Querdurchmesser von 50—70 Å aufgerollt.

Auch in den von mir untersuchten Spinalganglienzellen bestimmen neben einer diffusen, hellen *Grundsubstanz* Körnchen und Fäden von den genannten Ausmaßen die Struktur des Kernplasmas. Die relativ *kontrastarmen Fibrillen* konnte ich in den Dünnschnitten allerdings selten weiter als 1000 Å weit verfolgen und ihre Auflösung in feinere Filamente gelang nicht; jedoch ist teilweise eine Spiralisierung angedeutet zu erkennen. Sie bilden zum Teil ein lockeres Netzwerk, in dessen Maschen die kontrastarmen RNS-granula-ähnlichen Partikel einzeln, in Gruppen oder in kettenartiger Anordnung verteilt sind (Abb. 19). Ihre Anzahl

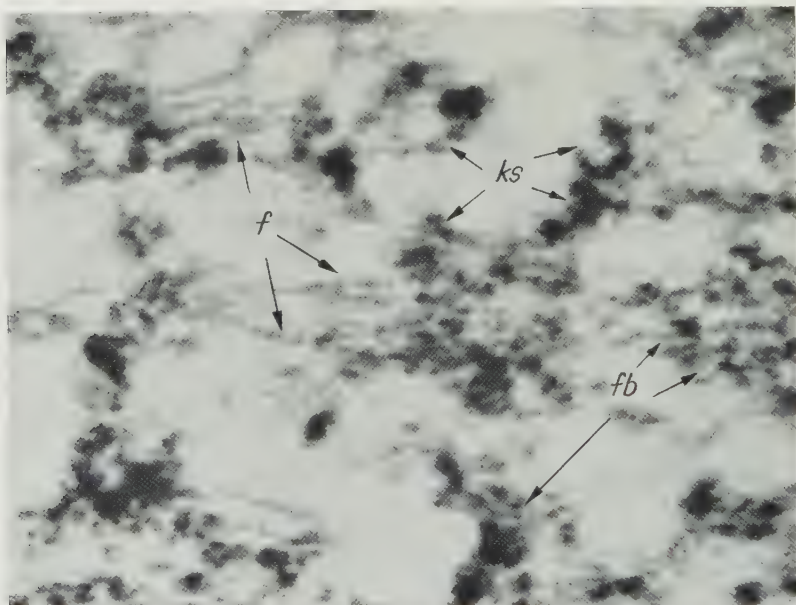


Abb. 19. Karyoplasmastruktur einer Ganglienzelle aus einem Ratten-Spinalganglion. In den Maschen kontrastarmer Filamente (*f*) liegen in unregelmäßiger Verteilung Karyosomen (*ks*). Zwischen den kontrastreichen Partikeln erscheinen die Filamente als helle Bänder (*fb*). Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 86000 ×

scheint in den Ganglienzellen vom Typ B etwas kleiner zu sein als in denen vom Typ A. Da sie im wesentlichen die Dichte des Karyoplasmas bestimmen, erscheinen die Kerne der kleinen sensiblen Zellen, die ohnehin gegen das dichte Zytoplasma abstechen, im Phasenkontrastmikroskop recht hell. Im folgenden sollen die zuletzt genannten Granula im Gegensatz zu den *Ribosomen* des Zytoplasmas *Karyosomen* genannt werden.

Bei hoher Vergrößerung haben diese rundlich bis polygonalen oder komma-förmig gestreckten Gebilde — ähnlich den Ribosomen — eine dunkle Randzone, in der kleinere Granula eng gelagert sein können (Abb. 20 b). Häufig ist die kontrastreiche, äußere Zone an einer Seite wie ein Hufeisen geöffnet oder nur als zwei parallel zueinander gestellte kurze Linien vorhanden. Eine ähnliche Strukturierung beschrieb RİS (1956) an Fragmenten von Chromosomenfäden.

Die *Kernplasma-Schollen* lösen sich im Elektronenmikroskop in unscharf begrenzte Verdichtungen auf, die Matrix, Fibrillen und Karyosomen in ziemlich gleichförmiger Verteilung enthalten.

Das fast immer runde *Kernkörperchen* ist bei phasenkontrastoptischer Vergrößerung in den kleineren Perikarya sehr dunkel und läßt nur angedeutet eine schollige Zeichnung erkennen. Kerne vom Typ B besitzen wahrscheinlich regelmäßig zwei Nukleolen, die oft so exzentrisch liegen, daß sie die Kernmembran zu berühren scheinen. Die Kerne der A-Zellen enthalten aber in der Regel nur einen Nukleolus und nicht zwei, wie HATAI (1901) bei Ratten festgestellt haben will. In den großen, hellen Perikarya lassen die Nukleolen schon in der Phasenkontrastübersicht auffallende Einzelheiten erkennen (Abb. 10). Im Innern kann man hellere und dunklere Zonen, vielfach auch feinste *bläschenartige Aufhellungen* von $0,2-0,5\mu$ unterscheiden, die bereits lichtoptisch wiederholt beschrieben wurden (SCHRÖN 1865, FLEMMING 1882, KÖRNER 1937a, HÖPKER 1953). Von der Nukleolusoberfläche erheben sich häufig *protuberanzenförmige Vorwölbungen*, durch die eine Erkennung des *Geschlechtsschromatins* (MOORE und BARR 1953) bei der Ratte sehr schwierig wird. Gelegentlich sieht man paranukleolär ein kleines, dunkles, etwa 1μ großes Körnchen, das mit großer Wahrscheinlichkeit dem „*Nukleolarsatelliten*“ entspricht (Abb. 10).

Wie neuere elektronenoptische Untersuchungen (HESS 1955, PALAY und PALADE 1955, HORSTMANN und KNOOP 1957) ergaben, kommt die von MJASSO-JEDOFF (1927) postulierte *Kernkörperchenmembran* in Ganglienzellen nicht vor. Dagegen konnte ein von ESTABLE und SOTELO (1951) lichtmikroskopisch beschriebenes Formelement, das sog. *Nukleolonema* elektronenmikroskopisch bestätigt werden (BERNHARD u. Mitarb. 1955, DE ROBERTIS 1956, HORSTMANN und KNOOP 1957 und YASUZUMI 1958). Es bildet im Interphasenkern vieler Zellen durch eine dichte, spiralförmige oder irreguläre Aufknäuelung das Grundgerüst des Nukleolus. Die Feinstruktur der etwa $200-300\text{ m}\mu$ dicken Nukleolonemata wird als sehr dicht und schwierig auflösbar (PORTER 1960), granulär (BERNHARD u. Mitarb. 1955, HORSTMANN und KNOOP 1957) oder auch als spiralförmig-fibrillär (YASUZUMI 1958) beschrieben.

Im Kernkörperchen der Spinalganglienzellen konnte ich wohlausgebildete Nukleolonemata nicht feststellen. Doch finden sich in jedem Nukleolus größere und kleinere Schollen entsprechend dicht strukturierten Materials, das ich im folgenden als *Komponente A* des Nukleolus bezeichnen möchte (Abb. 21). Diese Komponente läßt sich in technisch guten Bildern als ein feines Gewirr ineinander verflochtener und verschlungener Fäden auflösen, die — durch Brücken miteinander verbunden — ein Raumnetz bilden (Abb. 20a). Die einzelnen Fäden haben einen Querdurchmesser von etwa $40-90\text{ \AA}$. Auch schraubige Elemente in diesen Dimensionen, über die YASUZUMI u. Mitarb. (1958) berichten, konnte ich in der Komponente A beobachten.

Andere große Bezirke des Kernkörperchens bestehen aus etwas lockerer gepackten Karyosomen, die hier auffälliger als im Kernplasma, durch gerichtete Lagerung gewundene Bänder und Ketten bilden (*Komponente B* des Nukleolus) (Abb. 20b). Sie scheinen dadurch zu entstehen, daß Fäden von 90 \AA um eine hellere „Innenzzone“ Schlingen bilden, die sich dann mehr oder weniger rhythmisch abschnüren. Die oben beschriebene kontrastreiche Randzone der Karyosomen entspricht dann möglicherweise den Fadenbruchstücken.

Andere, gelegentlich recht große Areale des Nukleolus sind relativ hell. Sie enthalten neben der Grundmatrix sowohl Fibrillen, Fäden, als auch einige

Karyosomen (*Komponente C* des Nukleolus). Auch kontrastreichere Mischzonen der Komponente A und B kommen vor. Die protuberanzenartigen Vorwölbungen der Oberfläche zeigen keine neuen Strukturen. Stellenweise finden sich an der Kernkörperchenoberfläche Zungen aus kleinen, etwa 400—1000 Å großen Schollen der Komponente A in aufgelockerter Anordnung, die zum Karyoplasma hin abzubrockeln scheinen (Abb. 21 unten). Einige dieser Schollen liegen zuweilen weiter peripher verteilt im Karyoplasma. Das von mir als *Nukleolarsatellit*

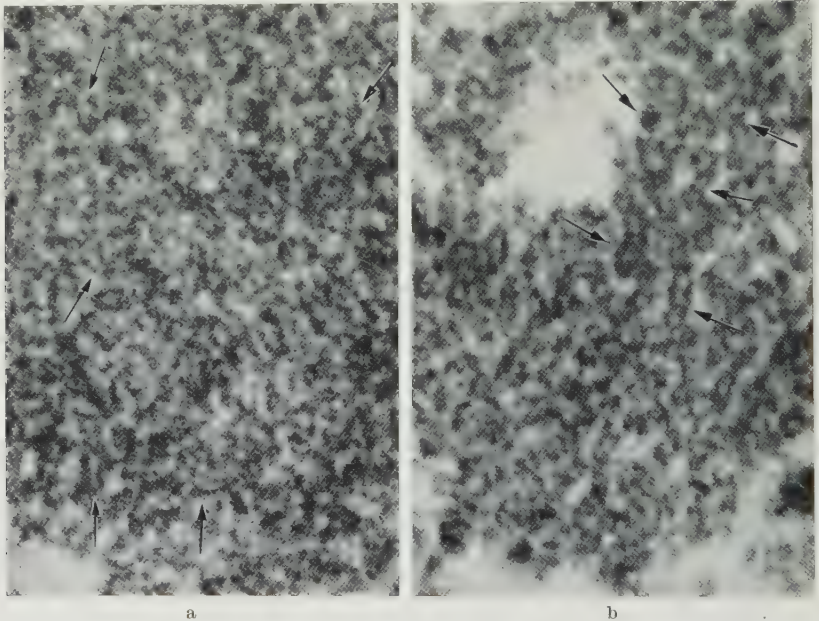


Abb. 20 a u. b. Ausschnitte aus einem Nukleolus einer Spinalganglienzelle. a Komponente A des Nukleolus, die Pfeile markieren die ineinander verschlungenen Filamente. b Oben Komponente B des Nukleolus, die Pfeile weisen auf Karyosomen hin, die durch Zusammenlagerung von Filamenten und Einbau von kontrastreichem Material zu entstehen scheinen. Die untere Bildhälfte zeigt eine Übergangszone von A nach B. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 105 000 ×

angesprochene Körnchen hat eine der Komponente A entsprechende Feinstruktur. Das ganze Kernkörperchen ist schließlich noch von hellen, 300—1000 Å großen Lichtungen durchsetzt, die ihm ein schwammartiges Aussehen verleihen. Sie bilden wahrscheinlich ein zusammenhängendes *Kanälchennetz*, das sich an einigen Stellen zisternenartig erweitert. In den großen Nukleolen können diese, nach ihrem Strukturbild Karyoplasmaanteile enthaltenden *Zisternen* bis mehr als 1 µ groß werden und sind dann als kleine, helle Bläschen lichtoptisch zu erkennen und als Nukleolarvakuolen schon wiederholt beschrieben (s. oben). Morphologisch bietet der Inhalt der Nukleolarakanäle und Zisternen das Bild des locker strukturierten Karyoplasmas.

d) **Perikaryatypen.** Eine Zerteilung der sensiblen Ganglienzellen in *große* „helle“ und *kleine* „dunkle“ Zellen wird schon seit langem regelmäßig durchgeführt. Eine ganze Anzahl von Autoren beschränkt sich in der morphologischen Typisierung ausdrücklich auf diese beiden Formen (STÖHR jr. 1928, EINARSON 1935). Trotzdem hat es wiederholt Stimmen gegeben, die die dunklen Zellen für

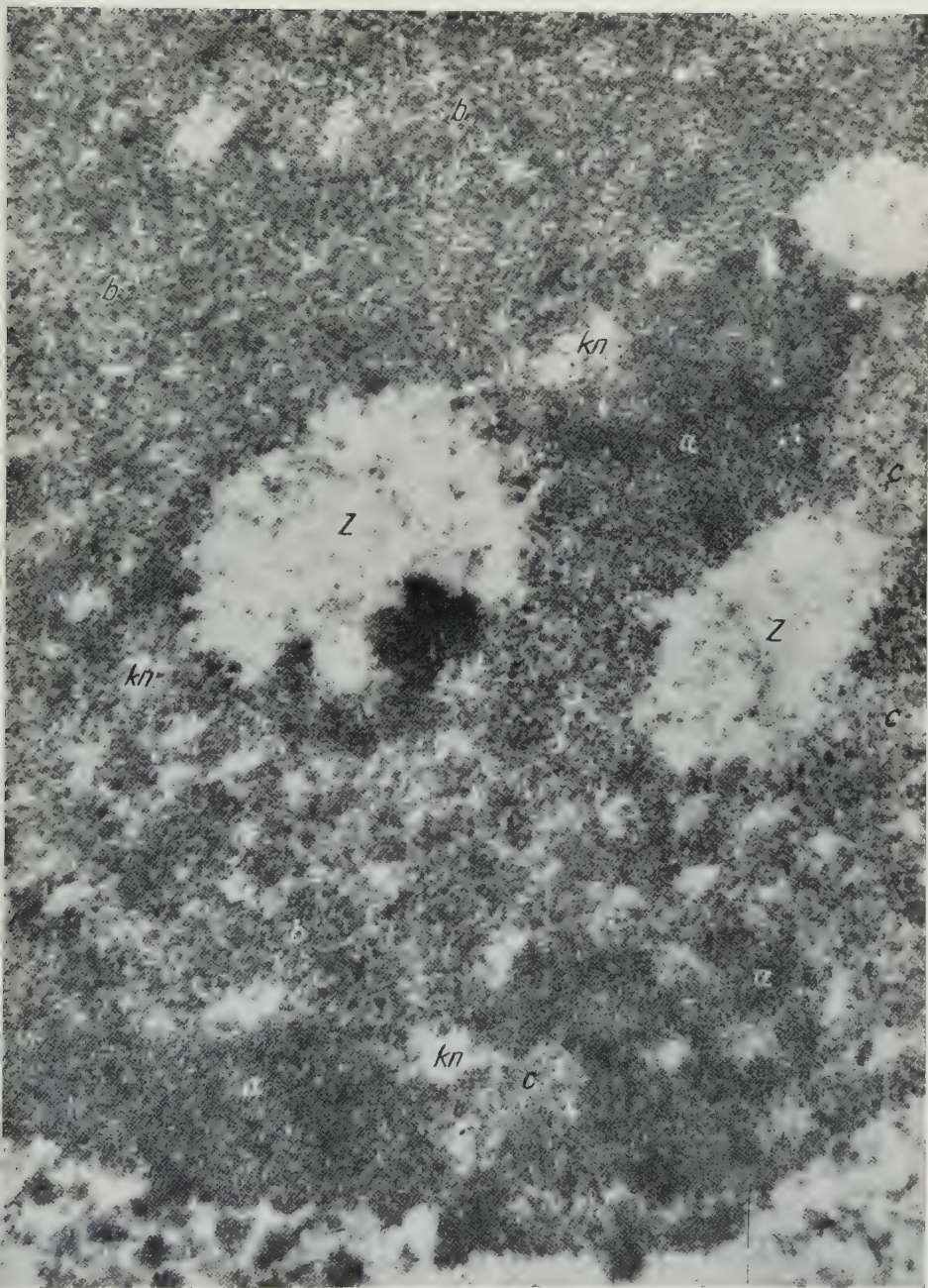


Abb. 21. Ausschnitt aus dem Nukleolus einer Spinalganglienzelle vom Typ A₁. Komponente A (a), Komponente B (b), Komponente C (c), Kanälchennetz (kn), Zisterne (z), Schollen am Kernkörperchenrand (unten). Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 50000 ×

Schrumpfungsartefakte hielten. Tatsächlich treten solche Artefakte häufig in Ganglien auf, sie können teilweise solitär zwischen gut fixierten Zellen liegen. FISCHER und RANSON (1934) gehen aber sicher zu weit, wenn sie die Existenz

der dichten Zellen in vivo vollkommen ablehnen. Bei der von mir angewandten Methode tritt offensichtlich dieses Schrumpfungsphänomen gar nicht auf, so daß der Dualismus helle — dunkle Zellen unter anderem immer eindeutig am



Abb. 22. Perikaryon vom Typ A₂ aus einem Ratten-Spinalganglion. Zwischen den Nissl-Schollen (nis) liegen sehr weite Neuroplasmastraßen (np). Im Gegensatz zum Neuroplasma wirkt der Satelliten-saum (sz) recht kontrastreich. Mitochondrien (mi), Kapillare (kp). Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 2000 ×

Kontrast des Zytoplasmas, der Verteilung der Nissl-Substanz und der Kernform zu differenzieren ist. Für diese beiden *Grundtypen* sensibler Ganglienzellen habe ich deshalb die A-B-Einteilung von HOSSACK und WYBURN (1954) übernommen.

Die morphologischen Unterschiede, die sich — wie oben ausgeführt — unter anderem in dem Aufbau der Pigmentkörnchen zeigen, lassen sich auch mit histochemischen Methoden bestätigen. So konnten SCHARF und OSTER (1957) im

Grundplasma der „dunklen“ Zellen einen erhöhten Phosphatidgehalt (Sphingomyelin) nachweisen, der mit dem stärkeren Kontrast des Neuroplasmas nach Osmiumtetroxydfixierung in Zusammenhang stehen könnte.

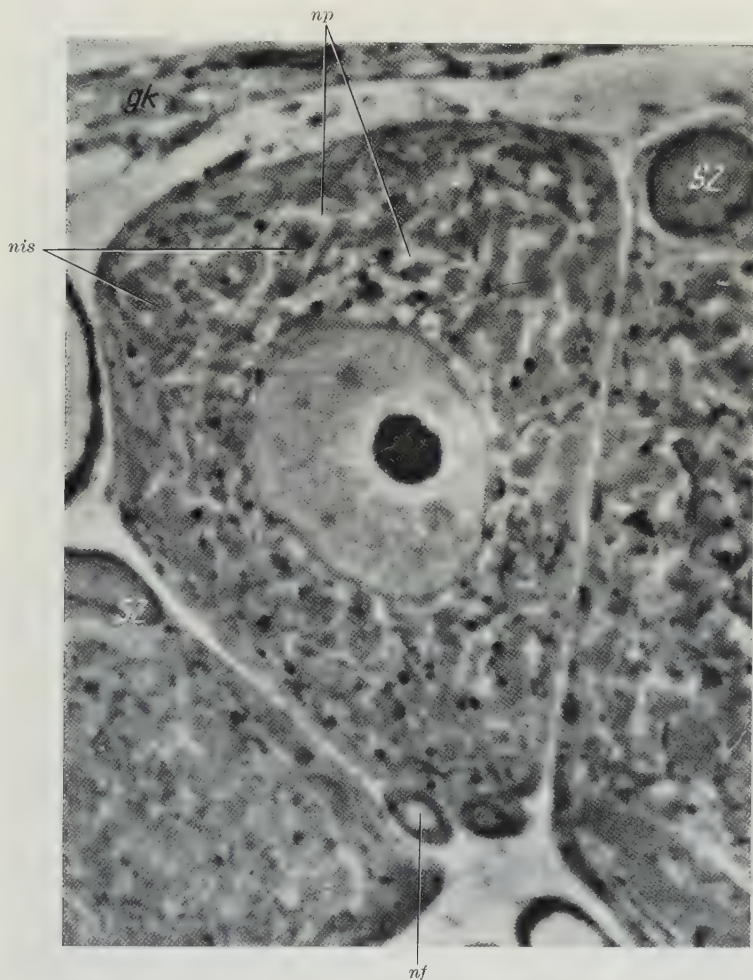


Abb. 23. Perikaryon vom Typ A_3 aus einem Ratten-Spinalganglion. Die Zelle ist nicht größer als große Exemplare vom Typ B_1 , sie zeigt aber die für die A-Gruppe typischen hellen Neuroplasmastraßen (np) zwischen den Nissl-Schollen (nis). Markarme Nervenfasern (nf), Satellitenzellen mit Kern von benachbarten Perikarya (sz), Ganglienkapselanschnitt (gk). Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 2000 \times

Der Einteilung der Ganglienzellen in zwei Typen stehen Typisierungen gegenüber, die andere Kriterien berücksichtigen und dabei oft zu einer recht reichhaltigen Formenskala kommen. DOGIEL (1908) stellte bei Berücksichtigung des *Faserverlaufs* insgesamt elf Typen fest. Eine so weitgehende Differenzierung wird heute jedoch allgemein abgelehnt (SCHARF 1958). Andere Neurohistologen (CLARK 1926, HIRT 1928, KÖRNER 1937a) zogen zur Zelldifferenzierung neben Zellgröße vor allen Dingen das Bild der *Nissl-Substanz-Verteilung* heran. Danach konnten 6–8 Ganglienzelltypen in sensiblen Ganglien unterschieden werden. In lumbalen Spinalganglien vom Hund findet CLARK (1926) fünf Typen seines Einteilungsschemas.

Die in dieser Arbeit angewandte Methodik erlaubte es mir, neben Größe, Form und Kontrast die Anordnung der Nissl-Substanz zu berücksichtigen und die beiden Grundtypen A und B noch wieder in je drei Zellformen zu differenzieren. Dabei kam ich zu einer Typeneinteilung, die mit dem Clarkschen Schema weitgehend übereinstimmt.

Mit Typ A_1 bezeichne ich 40—75 μ große Perikarya, die eine gleichmäßige Verteilung der Nissl-Schollen in ihrem hellen Zytoplasma zeigen (Abb. 10 und 13, Typ A, CLARK).

Typ A_2 ist eine Sonderform von A_1 , die zwischen den Tigroidkörpern besonders weite, helle Neuroplasmazonen trägt (Abb. 22). Im Verhältnis zur Zellgröße scheint sie einen recht dicken markhaltigen Neuriten abzugeben. Der Durchmesser von Typ A_2 liegt meist bei 45 μ (Typ B, CLARK).

Perikarya-Formen, die nicht wesentlich größer als Zellen der B-Gruppe sind, aber ein relativ helles Zytoplasma und die für die der A-Gruppe gemeinsamen Kriterien, wie Kernbild, Initialglomerulum und einen markhaltigen, wenn auch kleineren Neuriten zeigen, bezeichne ich als Typ A_3 (Abb. 23). Die Nissl-Schollen liegen in A_3 meist dichter gedrängt als in A_1 (Typ E_2 , CLARK).

Wie schon aus dem Größenvergleich (s. Tabelle) hervorgeht, ist eine Einstufung der Ganglienzellen nicht immer sicher durchzuführen. Sowohl zwischen A_1

Tabelle

Ratte	— L 5 und L 6 (ANDRES)		Hund	— L 6 und L 7 (CLARK 1926)			Neuronentypen im sensiblen Ganglion (SCHARF 1958)	
Typ	Perikarya Durch- messer in μ	%	Typ	Perikarya Durch- messer in μ	%	Funktion	Typ	Funktion
A_1	40—75	37	A	70	36,9	epikritisch	A_1 und A_3	epikritisch proprio- ceptiv
A_2	45	2	B	55	3,9		B	Bum-Dogielsches Neuron
A_3	30—40	7	E_2	42		viscero- sensibel	A_2	protopathisch viscero- sensibel
B_1	25—40	47	E_1	35	44,2			
B_2	18—30	6	D	25	10,1		D	Dogielsche Relaiszelle
B_3	unter 18	1	C	20	4,6	Spinalpara- sympathicus	C	Spinalparasymphathicus

und A_2 wie zwischen A_3 und B_1 als auch innerhalb der B-Gruppe gibt es fließende Übergänge.

Die Perikarya der B-Gruppe haben nur sehr dünne, markarme oder marklose Zellfortsätze. Ein Initialglomerulum ist im Schnittbild nicht mit Sicherheit zu erkennen. Die Satellitenzellen sind sehr flach und weisen im kontrastarmen Zytoplasma zahlreiche Querschnitte von Zellfortsätzen auf, die sowohl Dendriten anderer Zellen oder auch paraphytäre Ausläufer des zugehörigen Perikaryons darstellen können. Die Konturen der meist kleineren Nissl-Schollen sind bei dem Typ B_1 (25—40 μ) durch das relativ dunkel erscheinende Neuroplasma im Phasenkontrastbild fast vollständig maskiert (Abb. 11 und 14). Im zentral gelegenen Zytoplasmabereich der B_2 -Zellen (18—30 μ) ist die Maskierung weniger ausgesprochen, so daß gerade bei diesen Perikarya der für die B-Gruppe zum

normalen Erscheinungsbild gehörende Randschollenkranz der Tigroidkörper auffällt (Abb. 24).

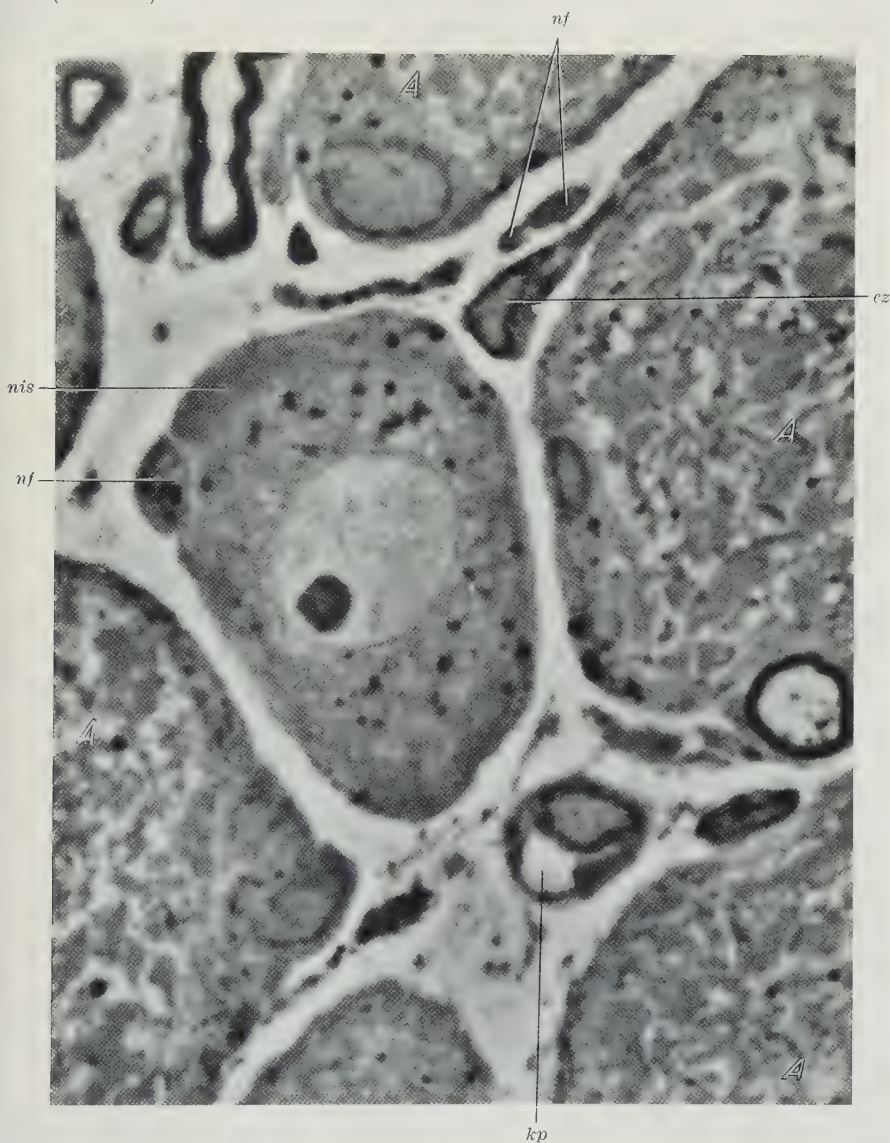


Abb. 24. Perikaryon vom Typ B_2 umgeben von A-Zellen (A). Das Zytoplasma in der Peripherie des Kernes erscheint weniger homogen als beim Typ B_1 . Randständige Nissl-Substanz (nis), marklose Nervenfasern (nf), Endoneurialzelle (ez), Kapillare (kp). Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 2000 \times

Typ B_1 dürfte im Clarkschen Schema etwa E_1 entsprechen, während B_2 morphologisch der Form D am ähnlichsten ist und mit etwa 6% der von CLARK angegebenen Häufigkeit ungefähr übereinstimmt.

Der B-Gruppe zugehörig sind dann schließlich noch sehr kleine Zellen (Typ B_3 , unter 18μ groß), die größenordnungsmäßig dem Typ C des Clarkschen Schemas

am nächsten stehen (Abb. 25). Auch sie tragen regelmäßig einen schmalen Satellitensaum. Dieser wird wahrscheinlich jeweils nur von einer Mantelzelle gebildet. Auch er enthält wie bei den größeren Perikarya feinste Nervenzell-

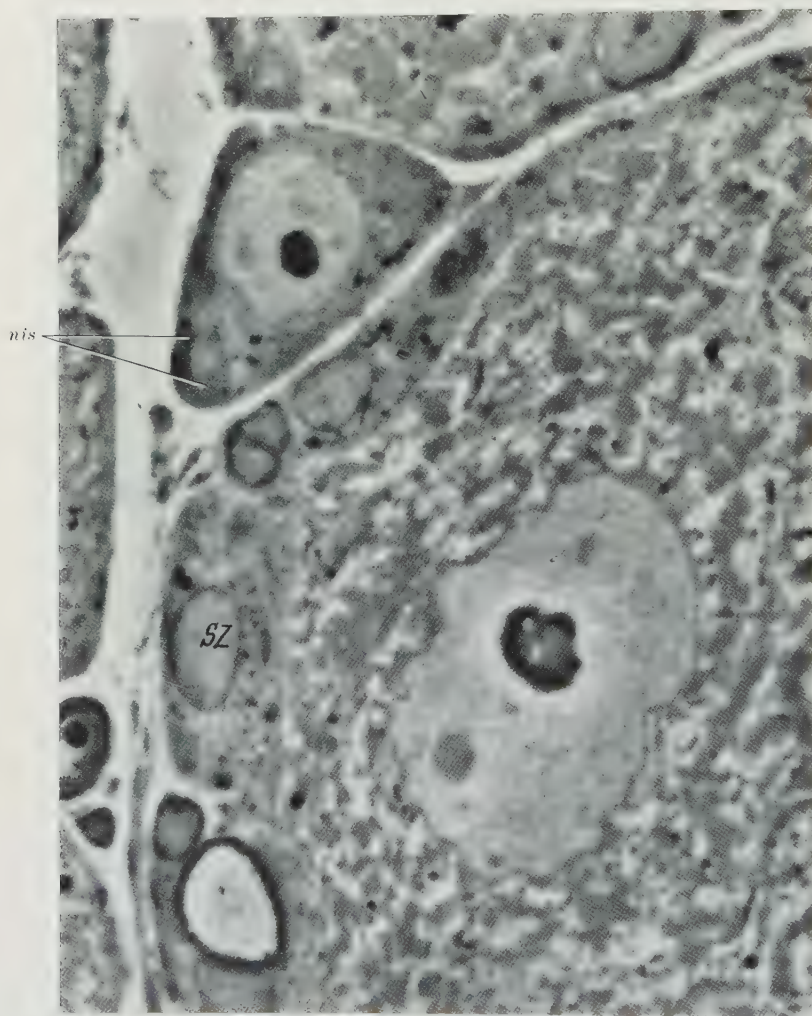


Abb. 25. Perikaryon vom Typ B_3 aus einem Ratten-Spinalganglion. Die Nissl-Substanz (*nis*) ist im Zytoplasma ungleichmäßig verteilt. Die Zelle ist kleiner als der Kern des darunterliegenden A_1 -Perikaryons, das eine besonders breite Satellitenzone trägt (*sz*). Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 2000 \times

ausläufer. Damit scheinen diese kleinsten Spinalganglienzellen funktionstüchtige Neurone zu sein und keine ruhenden „Neuroblasten“, die AGDUHR (1919/20) und HIRT (1928) bei jüngeren Hunden beobachtet haben wollen. Gegen eine Identifizierung der B_3 -Zellen mit Neuroblasten spricht auch die oft recht deutliche Nissl-Zeichnung, die Ausdruck einer aktiven nervösen Funktion sein dürfte. Die Kernkörperchen sind in diesen Zellen verhältnismäßig klein.

Angesichts der verschiedenen Zelltypen erhebt sich die Frage nach ihren speziellen Funktionen. Wie die Ergebnisse zahlreicher Degenerationsexperimente gezeigt haben, ist hier heute auf Grund morphologischer Merkmale eine gewisse Aussage möglich. Nach Untersuchungen von CLARK (1926) und HIRT (1928) darf

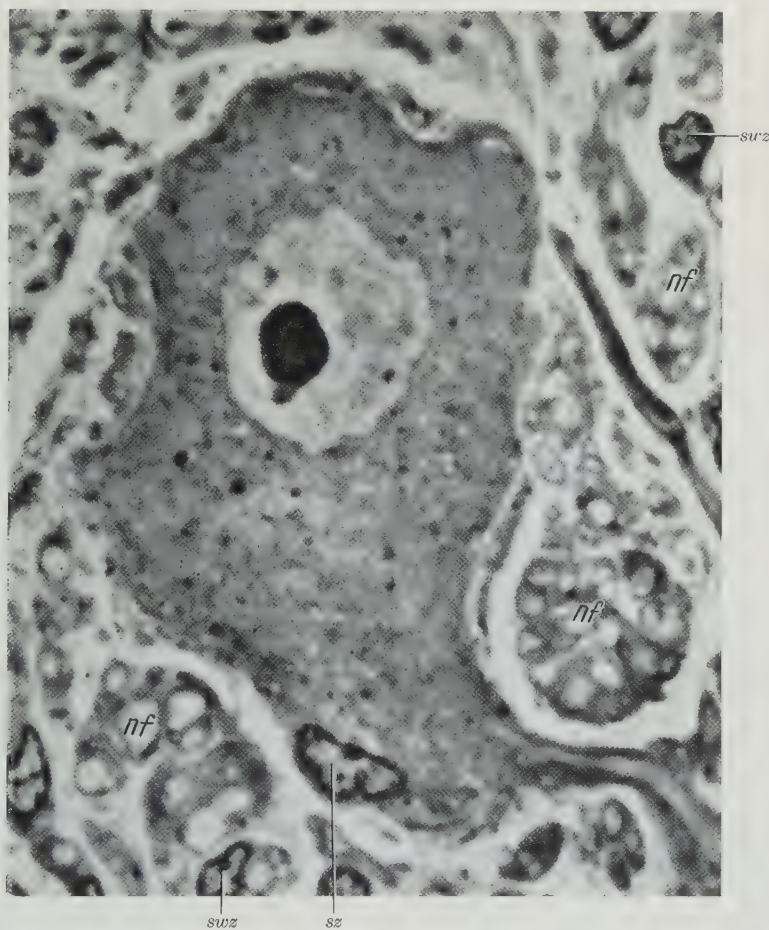


Abb. 26. Multipolare Ganglienzelle aus dem Ganglion cervicale craniale vom Kaninchen. Seine Zyto- und Karyoplasmastruktur ähnelt sehr der der Spinalganglienzellen vom Typ B. Die Kerne der Satelliten- und Schwannschen Zellen (sz, swz) sind artefiziell verändert. Bündel markloser Nervenfasern (nf). Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 2000 ×

als ziemlich sicher angenommen werden, daß große und mittelgroße Perikarya die epikritisch-sensiblen Neurone für Tast- und Tiefensensibilität repräsentieren. Dieses würde also für meine A-Gruppe zutreffen, zumindest für A₁ und A₂. WARRINGTON und GRIFFITH (1904) ordnen einigen großen Perikarya auch somato-(Haut)sensible und visceros-afferente Fasern zu.

Im Gegensatz hierzu müssen die Neurone des protopathischen Systems mit ihren markarmen oder marklosen Fasern von kleineren Zellen gebildet werden, d. h. in meiner Formentabelle im wesentlichen von der Typengruppe B. So haben interessanterweise Kern- und Zytoplasmastruktur der Perikarya aus dem

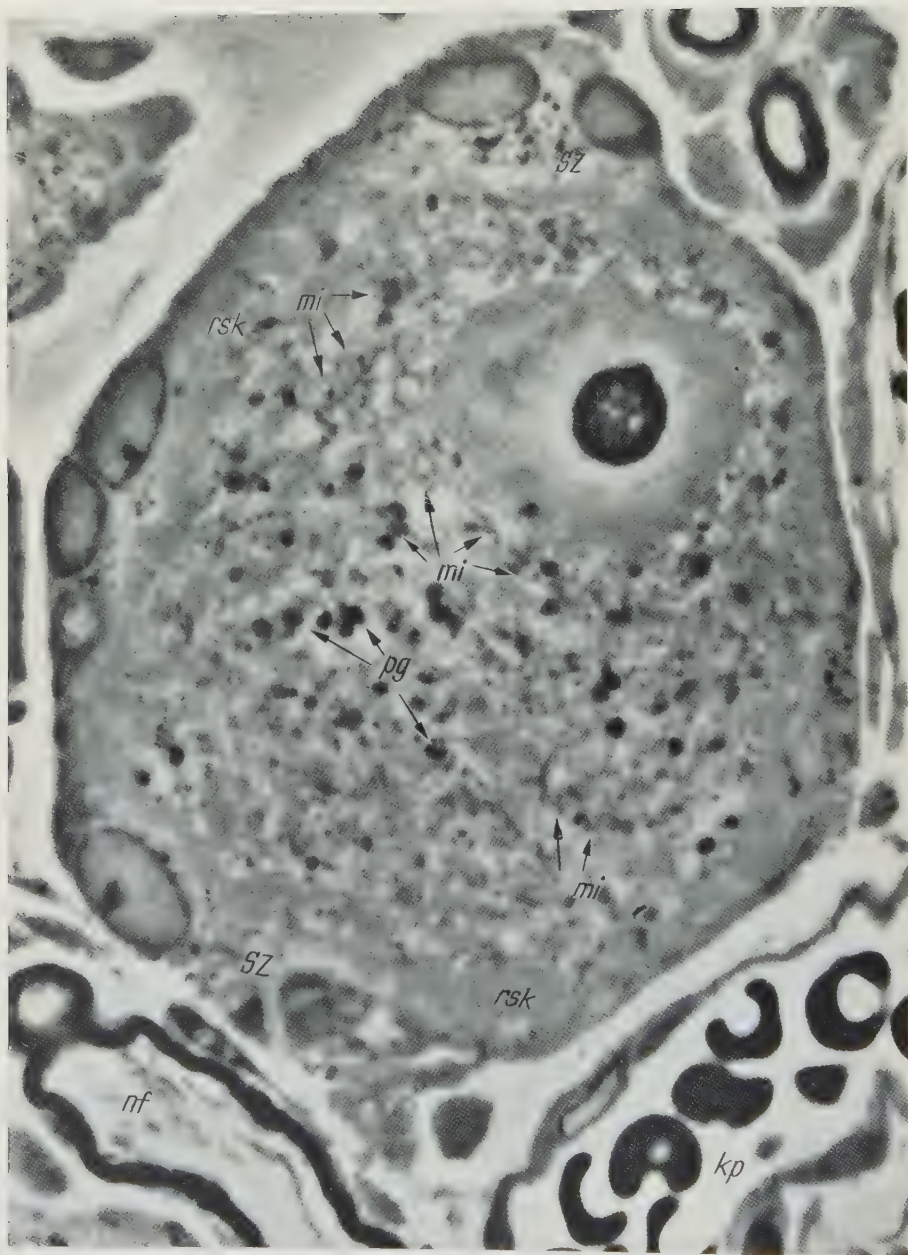


Abb. 27. „Fischaugenzelle“ aus einem normalen Ratten-Spinalganglion. Randständige Verlagerung der Tigroid-Substanz (*rsk*), Kern exzentrisch mit stark gewellter Oberfläche. Im Zentrum des Perikaryons Ansammlungen von Mitochondrien (*mi*) und Pigmentkörnchen (*pg*). Satellitenzellen (*sz*), markhaltige Nervenfasern (*nf*), unten rechts weite Kapillare. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 2000 \times

Ganglion cervicale craniale vom Kaninchen große Ähnlichkeit mit der der B-Zellen (Abb. 26). FILOGAMO und VIGLIONE (1955) ordnen viscerosensible Funktionen nur kleinen bis mittelgroßen Ganglienzellen zu. Zellen meiner Typengruppe B

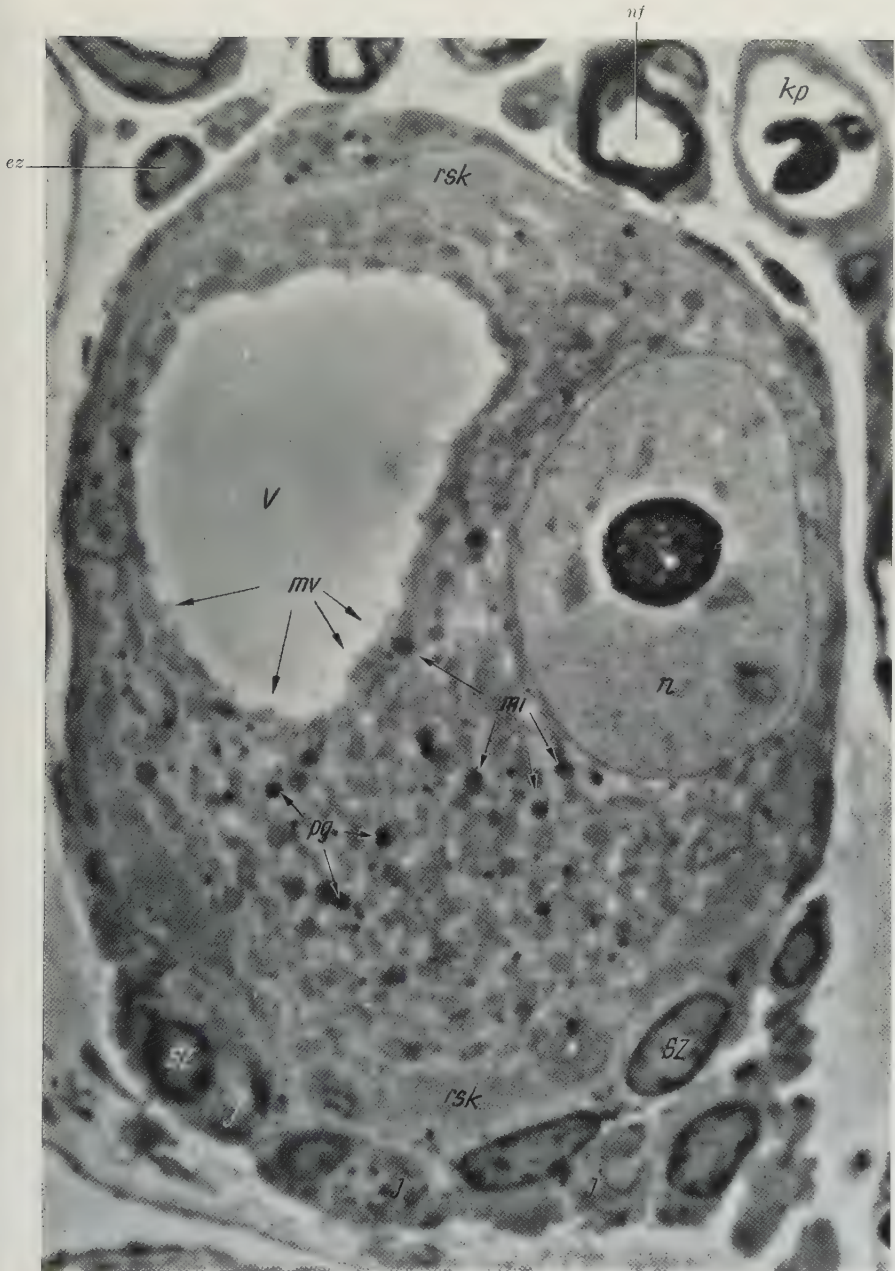


Abb. 28. „Gefensterter“ Perikaryon aus einem normalen Ratten-Spinalganglion. Exzentrischer Kern (*n*), Randschollenkranzbildung (*rsk*) der Nissl-Substanz, Pigmentgranula (*pg*) und große kugelige Mitochondrien (*mi*) in der Zellmitte, am Rande der großen Vakuole (*v*) sind Mikrovilli (*mv*) zu erkennen. Das Initialglomerulum (*j*) unten im Bild ist atrophisch, die Satellitenzellkerne (*sz*) enthalten vermehrt randständige Chromatinverdichtungen. Endoneuralzelle (*ez*), Kapillare (*kp*). Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 2000 ×

dürften danach den Hauptteil der viscerosensiblen und somato(Schmerz)-sensiblen Nervenzellen stellen.

Weiterhin muß die B-Gruppe aber auch visceroefferente Neurone des „Spinalparasymphikus“ (KURÉ 1931) enthalten. HIRT (1928) konnte das Vasomotorenzentrum der Nieren beim Hund durch Degenerationsexperimente im Spinalganglion Th 13 lokalisieren. Dabei sollen nur kleine und kleinste Perikarya degenerieren. Diese kleinen Zellen stimmen wahrscheinlich mit dem Typ C von CLARK und Typ B₂ und B₃ meiner Einteilung überein. Schließlich dürfte auch noch die Dogielsche Relaiszelle mit ihren kurzen dünnen Ausläufern der B-Gruppe angehören. Dagegen muß das Bum-Dogielsche Neuron mit seinem markhaltigen, pseudounipolaren Neuriten (DOGIEL 1897) morphologisch als ein A-Typ auftreten. In einer Tabelle habe ich die von mir ermittelten Perikaryotypen dem Clarkschen Einteilungsschema und dem von SCHARF (1958) zusammengestellten Neuronentypen der sensiblen Ganglien gegenübergestellt.

Eine genaue, durch Degenerationsexperimente belegte Funktionsanalyse meiner Ganglienzelltypen wird vermutlich genauere Kenntnisse bringen. Es hat sich nämlich gezeigt, daß auch das Erscheinungsbild der Tigrolyse mit der von mir angewandten Methode sehr genau zu erfassen ist (ANDRES 1961 b).

Gelegentlich trifft man auch schon in normalen Spinalganglien Zellen mit den typischen Zeichen einer „primären Reizung“ (Abb. 27). Höchstwahrscheinlich handelt es sich hier um isolierte, pathologische Zustandsbilder, da auch Degenerationsformen von Neuriten vereinzelt zur Beobachtung kommen. *Gefensterte Zellen*, die ebenfalls als Ausdruck krankhafter Veränderungen gelten, sind in normalen Ganglien von erwachsenen Tieren selten (Abb. 28).

Zusammenfassung

Mit einander ergänzenden phasenkontrast- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Ultradünnschnitten osmiumtetroxydfixierter Rattenspinalganglien wurde ein relativ umfangreiches Material ausgewertet. Damit konnten neben der Erhebung neuer Einzelbefunde auch Fragen gelöst werden, zu deren Beantwortung ein gewisser statistisch gesicherter Überblick der elektronenmikroskopischen Ergebnisse notwendig war.

1. Von den mesodermalen Anteilen der Ganglien bilden die interstitiellen Faserbündel mit den Gitterfasergeflechten der Blutgefäße und Nervenzellen ein zusammenhängendes System, das vorwiegend aus Kollagen-Fibrillen aufgebaut ist. Elastische Filamente treten im Endoneurium nur in der Peripherie von Arteriolen deutlich in Erscheinung. Morphologische Befunde und funktionelle Gesichtspunkte sprechen dafür, daß auch die Filamente der Basalmembranen, die die Blutgefäße und Satellitenhüllen gegen den Endoneuralspalt abgrenzen, über elastische Eigenschaften verfügen. Endoneurialzellen lassen sich elektronenmikroskopisch von den Satelliten unterscheiden, sie haben keine Basalmembran. Ihre Anzahl ist im Verhältnis zu den letzteren sehr klein.

2. Die Mantelzellen umgeben die Perikarya mit einer einschichtigen, geschlossenen Zellhülle. Ihre zytologische Differenzierung ist abhängig von dem Ganglienzelltyp, den sie umgeben. Neben den üblichen geformten Zellbestandteilen fallen im Zytoplasma zahlreiche Bläschen auf, die an bestimmten Stellen in das Perikaryon einzudringen scheinen. Es wird vermutet, daß die Vesikel in Verbindung mit den Nervenzellfortsätzen, die vielfach das Satellitenplasma

durchziehen, morphologischer Ausdruck einer Art Synapsenfunktion der Mantelzellen sind.

3. In den lumbalen Spinalganglien von Ratten bildet die Masse der Perikarya eine subkapsulär gelegene Mantelzone. Bedingt durch die dichte Zellpackung zeigen die meisten Ganglienzellen eine Polyedergestalt.

4. Die ausführliche Darstellung der Ultrastruktur der Zytoplasmabestandteile sowie des Zellaufbaues führte zwangsläufig zu einer Klassifizierung der Perikarya nach bestimmten morphologischen Merkmalen. Es konnten insgesamt sechs Zelltypen festgestellt werden, von denen sich je drei in zwei Typengruppen (A und B) zusammenfassen ließen. Die in der Regel größeren Zellen der Typengruppe A charakterisiert unter anderem ein helles Neuroplasma, eine ausgeprägte Nissl-Schollenzeichnung, markhaltige Neuriten und eine unregelmäßig gewellte Kernmembran. Die Perikarya der Typengruppe B haben dagegen ein relativ kontrastreiches Neuroplasma, in dem die Tigroidsubstanz mehr diffus verteilt liegt. Ihre Zellfortsätze sind sehr dünn und marklos oder markarm. Die glatte Kernoberfläche besitzt nur einige solitäre Eindellungen. Die Kerne der B-Zellen enthalten in der Regel zwei Kernkörperchen.

5. Als Formelemente des Karyoplasmas wurden Filamente und Granula (Karyosomen) näher beschrieben. Der Nukleolus setzt sich aus drei, im Feinbau voneinander abweichenden Komponenten zusammen, die mit den Buchstaben A (überwiegend fibrillär), B (überwiegend granulär) und C (locker gefügte Mischzone aus Fibrillen und Granula) bezeichnet wurden. Der Nukleolarsatellit enthielt immer nur Material der Komponente A. Die lichtoptisch bekannten Nukleolarvakuolen konnten als zisternenartige Erweiterungen eines den Nukleolus durchdringenden Kanälchennetzes identifiziert werden.

6. Durch Vergleichen der neuen Ergebnisse mit früheren Perikaryaklassifizierungen, deren Zellformen nach Degenerationsexperimenten mit bestimmten Innervationsfeldern in Verbindung gebracht worden waren, wurde der Versuch unternommen, die in dieser Arbeit festgestellten Ganglienzelltypen bestimmten Funktionen zuzuordnen.

Literatur

- ADAMKIEWICZ, A.: Zum Blutgefäßapparat der Ganglienzelle. *Anat. Anz.* **17**, 44—48 (1900).
- AFZELIUS, B. A.: The ultrastructure of the nuclear membrane of the sea urchin oocyte as studied with the electron microscope. *Exp. Cell Res.* **8**, 147—158 (1955).
- Electron microscopy on the basophilic structures of the sea urchin egg. *Z. Zellforsch.* **45**, 660—675 (1957).
- AGDUHR, E.: Studien über die postembryonale Entwicklung der Neuronen und die Verteilung der Neuriten in den Wurzeln der Spinalnerven. *J. Psychol. Neurol. (Lpz)* **25**, 463—626 (1919/20).
- ANDRES, K. H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über präparatorisch bedingte und postmortale Strukturveränderungen an Spinalganglienzellen. *Beitr. path. Anat.* (1961a, im Druck).
- Untersuchungen über morphologische Veränderungen in Spinalganglien während der retrograden Degeneration. *Z. Zellforsch.* **55**, 49—79 (1961).
- BACSICH, P., and G. M. WYBURN: Formalin — sensitive cells in spinal ganglia. *Quart. J. micr. Sci.* **94**, 89—92 (1953).
- BAHR, G. F., and W. BEERMAN: The fine structure of the nuclear membrane in the larval salivary gland and midgut of chironomus. *Exp. Cell Res.* **6**, 519—522 (1954).
- BARGMANN, W.: Über die Struktur der Blutkapillaren. *Dtsch. med. Wschr.* **83**, 1704—1710 (1958).

- BARGMANN, W., A. KNOOP u. TH. H. SCHIEBLER: Histologische, cytochemische und elektronenmikroskopische Untersuchung am Nephron (mit Berücksichtigung der Mitochondrien). *Z. Zellforsch.* **42**, 386—422 (1955).
- BEAMS, H. W., V. L. VAN BREEMEN, D. M. NEWFANG and T. C. EVANS: A correlated study on spinal ganglion cells and associated nerve fibers with the light and electron microscopes. *J. comp. Neurol.* **96**, 249—281 (1952).
- BERGMANN, L., and L. ALEXANDER: Vascular supply of the spinal ganglia. *Arch. Neurol. Psychiat.* (Chicago) **46**, 761—782 (1941).
- BERNHARD, W., A. BAUER, A. GROPP, F. HAGUENAU et CH. OBERLING: L'ultrastructure du nucléole de cellules normales et cancéreuses. *Exp. Cell Res.* **9**, 88—100 (1955).
- BJÖRKERUD, S., and T. ZELANDER: Ultrastructure of yellow pigment of human nerve cells. IV. *Internat. Kongr. für Elektronenmikroskopie*, Bd. II, S. 437—440. Berlin: Springer 1960.
- BLAIR, D. M., P. BACSICH and F. DAVIES: The nerve cells in the spinal ganglia. *J. Anat.* (Lond.) **70**, 1—9 (1936).
- BRETSCHNEIDER, L. H.: The electron microscope investigation of tissue sections, edit. by BOURNE and DANIELLI. *Int. Rev. Cytol.* **1**, 305—322 (1952).
- BRIERLEY, J. B.: The penetration of particulate matter from the cerebrospinal fluid into the spinal ganglia, peripheral nerves and perivascular spaces of the central nervous system. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, N. s. **13**, 203—215 (1950).
- The sensory ganglia: Recent anatomical, physiological and pathological contributions. *Acta psychiat.* (Kbh.) **30**, 553—576 (1955).
- BÜHLER, A.: Untersuchungen über den Bau der Nervenzellen. *Verh. phys.-med. Ges. Würzb.*, N. F. **31**, 285—392 (1898).
- CERVÓS-NAVARRO, J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Spinalganglien. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **199**, 643—662 (1959).
- Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Spinalganglien. II Satellitenzellen. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **200**, 267—283 (1960).
- CLARK, S. L.: Nissl granules of primary afferent neurones. *J. comp. Neurol.* **41**, 423—45 (1926).
- DAAE, H.: Zur Kenntnis der Spinalganglienzellen beim Säugetier. *Arch. mikr. Anat.* **31**, 223—235 (1888).
- DALTON, A. J., and M. D. FELIX: A comparative study of the Golgi complex. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl., 79—84 (1956).
- DAWSON, I. M., J. HOSSACK and G. M. WYBURN: Observations on the Nissl's substance, cytoplasmic filaments and the nuclear membrane of spinal ganglion cells. *Proc. roy. Soc. Lond. B* **144**, 132—142 (1955).
- DE CASTRO, F.: Die normale Histologie des peripheren vegetativen Nervensystems. Das Synapsenproblem: Anatomisch-experimentelle Untersuchungen. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **34**, 1—52 (1951).
- DE ROBERTIS, E.: The nucleo-cytoplasmic relationship and the basophilic substance (ergastoplasm) of nerve cells (electron microscope observations). *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 341—345 (1954a).
- The submicroscopic organization of the nerve axon as a basis of nerve function. *Gaz. méd. port.* **7**, 159—170 (1954b).
- Electron microscope observations on the submicroscopic morphology of the meiotic nucleus and chromosomes. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, 785—796 (1956).
- and H. S. BENNET: A submicroscopic vesicular component of Schwann cells and nerve satellite cells. *Exp. Cell Res.* **6**, 543—545 (1954).
- Submicroscopic morphology and function of the synapse. *Exp. Cell Res.* **15**, Suppl. 5, 347—369 (1958).
- DEL RIO HORTEGA, P.: Son homologables la glía de escasas radiaciones y la célula de Schwann. *Bol. Soc. esp. Biol.* **10**, 25—28 (1922).
- Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglia. *Mem. Soc. esp. Histor. Natur.* **14**, 1—122 (1928).
- El método del carbonato argéntico. Coloración de la neuroglia ganglionar. *Arch. Histol.* (B. Aires) **2**, 587—590 (1945).

- DOGIEL, A. S.: Zur Frage über den feineren Bau der Spinalganglien und deren Zellen bei Säugetieren. *Int. Mschr. Anat. Physiol.* **14**, 73—116 (1897).
- Der Bau der Spinalganglien des Menschen und der Säugetiere. Jena: Gustav Fischer 1908.
- EINARSON, L.: Notes on the morphology of the chromophil material of nerve cells and its relation to nuclear substances. *Amer. J. Anat.* **53**, 141—175 (1933).
- Histological analysis of the Nissl-pattern and -substance of nerve cells. *J. comp. Neurol.* **61**, 101—133 (1935).
- ELFVIN, L.-G.: The ultrastructure of unmyelinated fibers in the splenic nerve of the cat. *J. Ultrastruct. Res.* **1**, 428—454 (1958).
- ESTABLE, C., y J. R. SOTELO: Una nueva estructura celular: el nucleolonema. *Publ. Inst. Invest. Ciencias Biol.* **1**, 105—126 (1951).
- FERNÁNDEZ-MORÁN, H.: Electron microscope observations on the structure of the myelinated nerve fibre. *Exp. Cell Res.* **1**, 143—149 (1950).
- The submicroscopic organization of vertebrate nerve fibres. *Exp. Cell Res.* **3**, 282—359 (1952).
- The submicroscopic structure of nerve fibres. In: *Progress in biophysics and biophysical chemistry*, edit. by J. A. V. BUTLER and J. T. RANDALL, vol. IV. London: Pergamon Press 1954.
- Estudios sobre la organización submicroscópica del tálamo. In: *Actas y trabajos del VI. Congr. Latinoamericano de Neurocirugía*, p. 599—753, Montevideo 1955.
- FILOGAMO, G., e F. VIGLIONE: Caratteri citologici e numero dei neuroni esterocettivi nei gangli spinali destinati all'innervazione dell'arto anteriore, nel cane. *Atti Accad. naz. Lincei, Ser. VIII* **18**, 226—229 (1955).
- FISCHER, C., and S. W. RANSON: On the so-called sympathetic cells in the spinal ganglia. *J. Anat. (Lond.)* **68**, 1—10 (1934).
- FLEMMING, W.: Vom Bau der Spinalganglienzellen. In: *Beiträge zur Anatomie und Embryologie als Festgabe für JAK. HENLE*, S. 12—25. Bonn: Cohen 1882.
- Über den Bau der Spinalganglienzellen bei Säugethieren, und Bemerkungen über den der centralen Zellen. *Arch. mikr. Anat.* **46**, 379—394 (1895).
- GAGEL, O.: Tumoren der peripheren Nerven. In: *BUMKE-FOERSTERS Handbuch der Neurologie*, Bd. 9, S. 216—240. Berlin: Springer 1935.
- GASSER, H. S.: Properties of dorsal root unmyelinated fibers on the two sides of the ganglion. *J. gen. Physiol.* **38**, 709—728 (1955).
- Diskussionsbemerkung z. B. FRANKENHAEUSER: The hypothesis of saltatory conduction. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **17**, 32—36 (1952).
- GREENE, E. C.: *Gross anatomy in the rat in laboratory investigation*, p. 24—50. Philadelphia: J. B. Lippincott Company 1949.
- HANZON, V.: 1958, persönliche Mitteilung.
- HARTMANN, J. F.: Electron microscopy of nuclei in nerve cells. *Anat. Rec.* **112**, 340 (1952).
- HATAI, S.: The finer structure of the spinal ganglion cells in the white rat. *J. comp. Neurol.* **11**, 1—24 (1901).
- HEIDENHAIN, M.: *Plasma und Zelle*, Bd. II. 6. Abschnitt: Die nervöse Substanz, S. 687—944. Jena: Gustav Fischer 1911.
- HERTL, M.: Über den Nukleolarapparat der Nervenzellen im Hypothalamus der weißen Maus. *Z. Zellforsch.* **41**, 207—220 (1955).
- Zum Nucleolus-Problem. *Z. Zellforsch.* **46**, 18—51 (1957).
- HERZOG, E.: Über die periphere Glia in den Sympathischen Ganglien. *Z. Zellforsch.* **40**, 199—206 (1954).
- HESS, A.: The fine structure of young and old spinal ganglia. *Anat. Rec.* **123**, 399—423 (1955).
- , and A. J. LANSING: The fine structure of peripheral nerve fibres. *Anat. Rec.* **117**, 175—200 (1953).
- HIRT, A.: Über den Aufbau des Spinalganglions und seine Beziehungen zum Sympathicus. *Z. Anat.* **87**, 275—318 (1928).
- HIS, W.: Die Entwicklung der ersten Nervenbahnen beim menschlichen Embryo. Übersichtliche Darstellung. *Arch. Anat. u. Physiol., Anat. Abt.* **1887**, 368—378.
- HÖPKER, W.: Über den Nukleolus der Nervenzelle. *Z. Zellforsch.* **38**, 218—229 (1953).

- HONJIN, R.: Electron microscopy of peripheral nerve fibers. *Okajimas Folia anat. jap.* **27**, (4), 179—191 (1955).
- HORSTMANN, E., u. A. KNOOP: Zur Struktur des Nukleolus und des Kernes. *Z. Zellforsch.* **46**, 100—107 (1957).
- HOSSACK, J., and G. M. WYBURN: Electron microscopic studies of spinal ganglion cells. *Proc. roy. Soc. Edinb., Sect. 65* (II), 239—250 (1954).
- HYDÉN, H.: Protein and nucleotide metabolism in the nerve cell under different functional conditions. *Symp. Soc. exp. Biol.* **1**, 152—162 (1947).
- Die Funktion des Kernkörperchens bei der Eiweißbildung in Nervenzellen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **54**, 96—130 (1944).
- KARRER, H. E.: The fine structure of connective tissue in the tunica propria of bronchioles. *J. Ultrastruct. Res.* **2**, 96—121 (1958).
- KEY, A., and G. RETZIUS: Studien in der Anatomie des Nervensystems. *Arch. mikr. Anat.* **9**, 308—386 (1873).
- Studien in der Anatomie des Nervensystems und des Bindegewebes. Stockholm: Samson and Wallin 1875/76.
- KISS, F.: Sympathetic elements in the cranial and spinal ganglia. *J. Anat. (Lond.)* **66**, 488—498 (1932).
- KÖLLIKER, A. v.: *Mikroskopische Anatomie oder Gewebelehre des Menschen*, Bd. II/1. Leipzig: Wilhelm Engelmann 1850. 5. Aufl. 1867.
- KÖRNER, F.: Variationsstatistische Untersuchungen über die Größe der Kerne und der Kernkörperchen menschlicher Nervenzellen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **42**, 81—115 (1937a).
- Beobachtungen über den Austritt geformter Substanzen aus dem Kernkörperchen bei menschlichen Nervenzellen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **42**, 362—378 (1937b).
- KONEFF, H.: Beiträge zur Kenntnis der Nervenzellen der peripheren Ganglien. *Mitt. naturforsch. Ges. Bern* 13—44 (1887).
- KORNMÜLLER, A. E.: Erregbarkeitssteuernde Elemente und Systeme des Nervensystems, Grundriß ihrer Morphologie, Physiologie und Klinik. *Fortschr. Neurol. Psychiat.* **18**, 437—467 (1950).
- KUBOTA, K., u. K. HIOKI: Zytologische Untersuchungen der Mantelzellen im menschlichen Spinalganglion. *Folia anat. jap.* **22**, 111—126 (1943).
- KÜHN, K., u. E. GEBHARDT: Chemische und elektronenoptische Untersuchungen über die Reaktion von Chrom (III)-Komplexen mit Kollagen. *Z. Naturforsch.* **15b**, 23—60 (1960).
- KURÉ, K.: Über den Spinalparasymphikus. Basel: Benno Schwabe & Co. 1931.
- LAIDLAW, G. F.: Silver staining of the endoneural fibers of the cerebrospinal nerves. *Amer. J. Path.* **6**, 435—443 (1930).
- LANDSTRÖM, H., T. CASPERSSON u. G. WOHLFAHRT: Über den Nukleotidumsatz der Nervenzelle. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **49**, 534—548 (1940/41).
- LEHMANN, H.-J.: Über Struktur und Funktion der perineuralen Diffusionsbarriere. *Z. Zellforsch.* **46**, 232—241 (1957).
- Die Nervenfasern. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Nervensystem IV. Teil, Erg. z. Bd. IV/1, S. 315—701. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.
- LENHOSSÉK, M. v.: Über den Bau der Spinalganglienzellen des Menschen. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **29**, 345—380 (1897).
- Zur Kenntnis der Spinalganglienzellen. *Arch. mikr. Anat.* **69**, 245—263 (1906).
- LEVI, G.: Struttura ed istogenesi dei gangli cerebrospinali dei mammiferi. *Anat. Anz.* **30**, 180—196 (1907).
- LINDNER, E.: Die submikroskopische Morphologie des Herzmuskels. *Z. Zellforsch.* **45**, 702—746 (1957).
- MJASSOJEDOFF, S. W.: Das Kernkörperchen und seine Beziehung zu den Chromatinelementen des Kernes. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **9**, 404—467 (1927).
- MOORE, D. H., and M. L. BARR: Morphology of the nerve cell nucleus in mammals, with special reference to the sex chromatin. *J. comp. Neurol.* **98**, 213—231 (1953).
- , and P. M. GRIMLEY: Problems in methacrylate embedding for electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 255—260 (1957).
- , and H. RUSKA: The fine structure of capillaries and small arteries. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 457—461 (1957).

- MÜLLER, E.: Untersuchungen über den Bau der Spinalganglien. Nord. med. Ark. **23**, (N. F. 1), Nr 26, 1—55 (1891).
- ORTIZ-PICON, J. M.: The neuroglia of the sensory ganglia. Anat. Rec. **121**, 513—529 (1955).
- PALADE, G. E.: A small particulate component of the cytoplasm. J. biophys. biochem. Cytol. **1**, 59—68 (1955).
- , and S. L. PALAY: The fine structure of neurons. J. biophys. biochem. Cytol. **1**, 69—88 (1955).
- PALAY, S. L., and G. E. PALADE: The fine structure of neuronal cytoplasm. J. appl. Physics **24**, 1419—1420 (1953).
- PANNESE, E.: Observations on the morphology, submicroscopic structure and biological properties of satellite cells (s. c.) in sensory ganglia of mammals. Z. Zellforsch. **52**, 567—597 (1960).
- PAPPENHEIMER, J. R.: Zit. von W. BARGMANN, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, S. 244—245. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- PEASE, D. C.: Electron microscopy of the vascular bed of the kidney cortex. Anat. Rec. **121**, 701—721 (1955).
- PLENK, H.: Über argyrophile Fasern (Gitterfasern) und ihre Bildungszellen. Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. **27**, 302—412 (1927).
- PORTER, K. R.: Electron microscopy of basophilic components of cytoplasm. J. Histochem. Cytochem. **2**, 346—375 (1954).
- Problems in the study of nuclear fine structure. IV. Internat. Kongr. für Elektronenmikroskopie, Verh.-Bd. II, S. 186—199. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- RAMON Y CAJAL: Nuevo concepto de la histología de los centros nerviosos. Barcelona 1893. Deutsche Übersetzung (wesentlich erweitert) v. H. HELD: Neue Darstellung vom histologischen Bau des Zentralnervensystems. Arch. Anat. Physiol., Anat. Abt. **1893**, 319—428.
- Algunas variaciones fisiológicas y patológicas del aparato reticular de Golgi. Trab. Lab. Invest. biol. Univ. Madr. **12**, 127—227 (1914).
- REBHUN, L. I.: Nuclear changes during spermiogenesis in a pulmonate snail. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 509—524 (1957).
- RETZIUS, G.: Untersuchungen über die Nervenzellen der cerebrospinalen Ganglien und der übrigen peripherischen Kopfganglien mit besonderer Berücksichtigung auf die Zellenausläufer. Arch. Anat. **369—402** (1880).
- RHODIN, J.: Electron microscopy of the glomerular capillary wall. Exp. Cell Res. **8**, 572—574 (1955).
- RIS, H.: A study of chromosomes with the electron microscope. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl. 385—392 (1956).
- ROBERTSON, J. D.: The ultrastructure of adult vertebrate peripheral myelinated fibers in relation to myelogenesis. J. biophys. biochem. Cytol. **1**, 271—278 (1955).
- RUTHMANN, A.: Basophilic lamellar systems in the crayfish spermatocyte. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 267—274 (1958).
- SCHARENBERG, K.: Glia and the elements of Schwann of the human Gasserian ganglion. Trab. Inst. Cajal Invest. biol. **44**, 75—94 (1952).
- SCHARF, J. H.: Sensible Ganglien. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Erg.-Bd. IV/1. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.
- , u. K. OSTER: Zur fluoreszenzmikroskopischen Unterscheidbarkeit „heller“ und „dunkler“ pseudounipolarer Ganglienzellen im Ganglion semilunare des Rindes. Acta histochem. (Jena) **4**, 65—89 (1957).
- SCHMITT, F. O., C. E. HALL and M. A. JAKUS: Electron microscope investigations of the structure of collagen. J. cell. comp. Physiol. **20**, 11—33 (1942).
- SCHRÖN, O.: Über das Korn im Keimfleck und in den Kernkörperchen der Ganglienzellen bei den Säugethieren. Unters. Naturlehre Menschen u. Thiere **9**, 209—216 (1865).
- SJÖSTRAND, F. S.: The ultrastructure of the outer segments of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscope. J. cell. comp. Physiol. **42**, 15 (1953).
- , and V. HANZON: Membrane structures of cytoplasm and mitochondria in exocrine cells of mouse pancreas. Exp. Cell Res. **7**, 393—414 (1954).

- STÖHR jr., PH.: Das periphere Nervensystem. A. Die Anteile des cerebrospinalen Nervensystems. In v. MÖLLENDORFFs Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. IV/1, S. 202—264. Berlin: Springer 1928.
- Zusammenfassende Ergebnisse über die normale und pathologische Histologie der sympathischen Ganglienzelle und der Endapparate im vegetativen Nervensystem. *Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch.* **33**, 135—284 (1941).
- Anatomische Grundlagen der Lehre vom vegetativen Nervensystem. Regensburg. *Jb. ärztl. Fortbild.* **2**, 203—212 (1951/53).
- SWIFT, H.: The fine structure of annulated lamellae. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl., 415—418 (1956).
- THEIL, A.: Licht- und elektronenmikroskopische Studie über die Nierenkörperchen der griechischen Landschildkröte. *Z. Zellforsch.* **47**, 288—319 (1958).
- WARRINGTON, W. B., and F. GRIFFITH: On the cells of the spinal ganglia and on the relationship of their histological structure to the axonal distribution. *Brain* **27**, 297—326 (1904).
- WATSON, M. L.: The nuclear envelope. Its structure and relation to cytoplasmic membranes. *J. biophys. biochem. Cytol.* **1**, 257—270 (1955).
- Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 475—478 (1958).
- Further observations on the nuclear envelope of the animal cells. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 147—156 (1959).
- WOLFERS, C.: Die Querstreifung der kollagenen Bindegewebsfibrille. *Virchows Arch. path. Anat.* **312** (1944).
- WYBURN, B. M.: The capsule of spinal ganglion cells. *J. Anat. (Lond.)* **92**, 528—533 (1958).
- YASUZUMI, G., T. SAWADA, R. SUGIHARA, M. KIRYAMA and M. SUGIOKA: Electron microscope researches on the ultrastructure of nucleoli in animal tissues. *Z. Zellforsch.* **48**, 10—23 (1958).

Dr. med. KARL HERMANN ANDRES,
Histologisches Institut der Universität des Saarlandes,
Homburg (Saar), Univ.-Krankenhaus

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Uppsala (Direktor: Prof. Dr. B. REXED)

UNTERSUCHUNGEN ÜBER MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN IN SPINALGANGLIEN WÄHREND DER RETROGRADEN DEGENERATION *

Von

K. H. ANDRES

Mit 18 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. April 1961)

Inhalt

	Seite
I. Einleitung	49
II. Material und Methodik	50
III. Befunde	50
1. Phasenkontrastoptische Übersichtsuntersuchungen	50
2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Feinstruktur	55
a) Nissl-Substanz S. 55. — b) Neurofilamente und Neuroplasma S. 59. —	
c) Mitochondrien S. 59. — d) Pigmentkörnchen S. 65. — e) Golgi-Apparat	
S. 65. — f) Zellkern S. 67. — g) Satellitenhülle und Schwannsche Scheide S. 69.	
IV. Diskussion	73
Zusammenfassung	76
Literatur	77

I. Einleitung

Unsere Kenntnis über die morphologischen Veränderungen während des Ablaufs der chromatolytischen Reaktion in Nervenzellen ist in den letzten Jahren unter verschiedenen Aspekten in Übersichten zusammengefaßt worden (ALTMANN 1955, DÖRING 1955, SCHARF 1958, HILD 1959). Es liegt in der Natur der Sache, daß in den zahlreichen Arbeiten über die Chromatolyse neben dem Verhalten des Kernes in erster Linie die Umwandlung der Nissl-Substanz im Vordergrund der Betrachtung stand.

Gerade diese auffälligen, seit NISSL (1894) bekannten Umwandlungen spielen bei der Anwendung der retrograden Degeneration als neurohistologische Methode (KLEIST 1904, LUGARO 1904, WARRINGTON und GRIFFITH 1904) ein entscheidendes Kriterium. Auch die zahlreichen ultraviolett-spektrometrischen Untersuchungen an chromatolytischen Nervenzellen aus der Schule von HYDÉN (1943, 1950) sowie von GERSH und BODIAN (1943) befaßten sich vornehmlich mit Kern- und Nissl-Substanzveränderungen.

Demgegenüber liegen nur verhältnismäßig wenige Mitteilungen über Umwandlungen des Golgi-Apparates, der Neurofibrillen und des Neuroplasmas vor. Auf die mangelhafte Kenntnis über das Verhalten der Neurosomen bei chromatolytischen Reaktionen weist ALTMANN (1955) ausdrücklich hin. Ebenso HILD (1959), wenn er konstatiert, daß über die Veränderungen des Chondrioms nur wenige Ergebnisse vorlägen.

* Durchgeführt mit Unterstützung durch den Schwedischen Medizinischen Forschungsrat.
Z. Zellforsch., Bd. 55

HARTMANN (1954) konnte in retrograd degenerierten Nervenzellen erstmalig elektronenmikroskopisch bestimmte Zytosomen als Mitochondrien identifizieren und damit frühere eigene Arbeiten (1948, 1949) über das Verhalten des Chondrioms während der „primären Reizung“ bestätigen. Aus technisch bedingten Mängeln mußte diese Untersuchung im übrigen aber noch unergiebig bleiben.

Über experimentell ausgelöste Veränderungen in Nissl-Schollen von Spinalganglienzellen berichten in einer elektronenmikroskopischen Studie ANDERSON und VAN BREEMEN (1958). Durch intraperitoneale Malononitril-Injektion erzeugten die Autoren bei *Rana pipiens* einen „Aufbruch“ des endoplasmatischen Retikulums. Da es bei diesen Versuchen jedoch nicht zur Auflösung der Nissl-Schollen kam und darüber hinaus HYDÉN und HARTELIUS (1949) zeigen konnten, daß Malononitril-Gaben zu einer Vermehrung der Ribonukleinsäure in Nervenzellen führen, dürfen die Befunde von ANDERSON und VAN BREEMEN wohl nur bedingt als chromatolytische Reaktion aufgefaßt werden.

Neben diesen beiden elektronenmikroskopischen Arbeiten und einer eigenen kurzen Mitteilung (ANDRES 1960) liegen zur Zeit keine weiteren Veröffentlichungen über submikroskopische Veränderungen in chromatolytischen Nervenzellen vor.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war deshalb, die morphologischen Umwandlungen von Spinalganglienzellen während des Ablaufes der retrograden Degeneration, insbesondere im Bereich der Ultrastruktur eingehend zu erfassen. Mit Hilfe präliminarer, phasenkontrastmikroskopischer Übersichtsuntersuchungen gelang es, typisch veränderte Perikarya für die Beobachtung und photographische Aufnahme im Elektronenmikroskop auszuwählen, so daß ein relativ umfangreiches Material ausgewertet werden konnte.

II. Material und Methodik

Als Untersuchungsmaterial dienten Rattenspinalganglien (L VI), deren Feinbau in einer anderen Arbeit unter Anwendung der gleichen Methodik ausführlich beschrieben worden ist (ANDRES 1961a).

In zwei Versuchsserien wurden insgesamt 40 weibliche, 250–300 g schwere Albinoratten untersucht. In der ersten Serie erfolgte die periphere Neurotomie des N. ischiadicus dextr. etwa 2,5 cm peripher vom Austritt aus dem Wirbelkanal. Um die Anzahl der chromatolytischen Zellen zu erhöhen, wurde in der zweiten Versuchsserie außer diesem Eingriff noch die Radix dorsalis dicht vor dem Ganglion durchtrennt.

Zur Untersuchung kam ausschließlich das sechste Lumbalganglion, aus dem in der Regel der größte Anteil der sensiblen Fasern des Ischiadicus hervorgeht.

Die Ganglien wurden nach der Operation in Abständen von Stunden, Tagen, 2, 3 und 4 Wochen unter Nembutal-Narkose exstirpiert und nach Osmiumtetroxydfixierung (Sjöstrand 1953) in N-Butylmethacrylat eingebettet.

0,5 μ dicke Ultramikrotomschnitte wurden für die phasenkontrastmikroskopischen Voruntersuchungen auf Glasobjektträger in Paraffinum liquidum eingedeckt. Zur Kontrasterhöhung der Ultradünnschnitte (300–400 Å) für die elektronenoptische Auswertung verwendete ich konzentrierte Uranylazetatlösung nach Angaben von WATSON (1958). Über nähere Einzelheiten über die in dieser Arbeit angewandten Methodik siehe ANDRES (1961a, b).

III. Befunde

1. Phasenkontrastoptische Übersichtsuntersuchungen

Die Anwendung der neuen Methodik in der vorliegenden Untersuchung macht es notwendig, zunächst näher auf die zum großen Teil wohlbekannten, lichtmikroskopisch in den Perikarya feststellbaren retrograden Veränderungen ein-

zugehen. Dabei sollen die von BODIAN und MELLORS (1945) für Chromatolyse-Stadien in motorischen Vorderhornzellen eingeführten Bezeichnungen über-

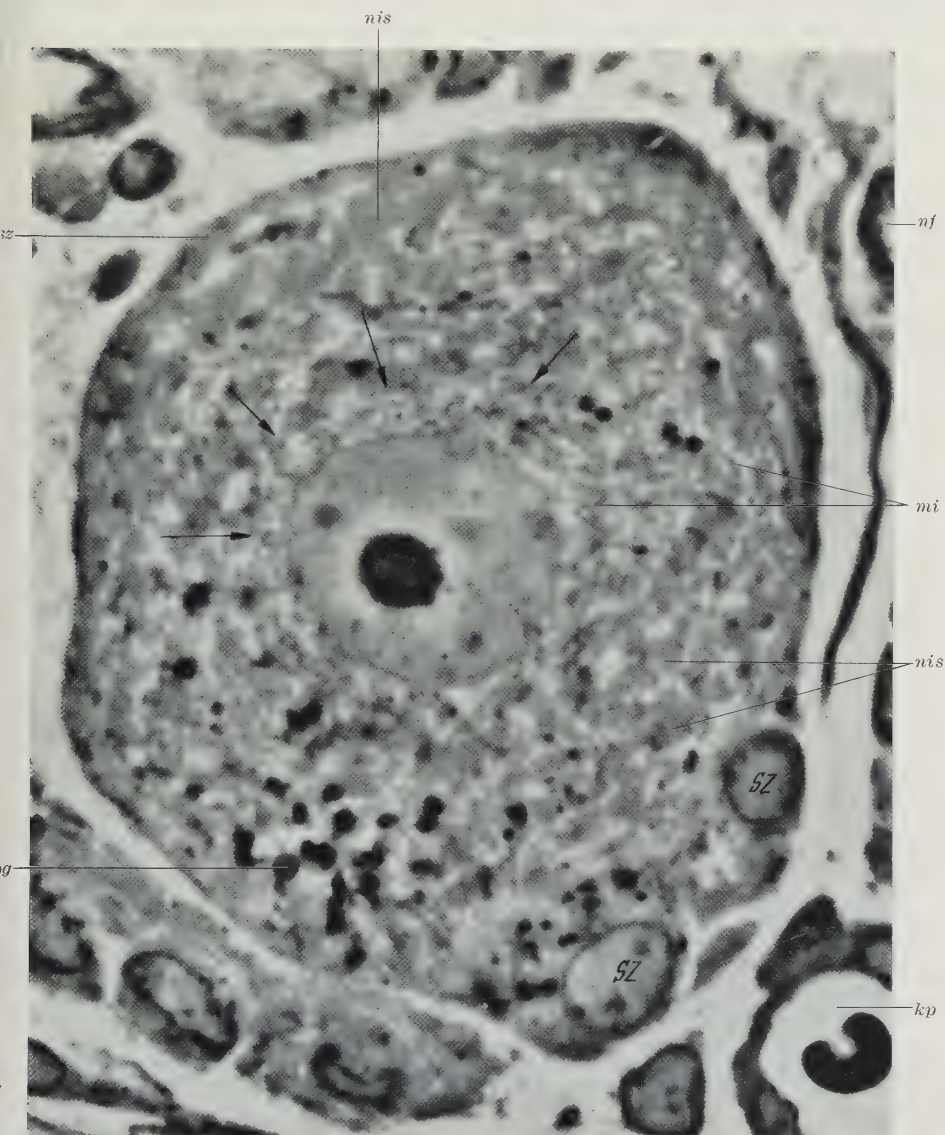


Abb. 1. Perikaryon vom Typ A₁ aus Spinalganglion L VI der Ratte im Stadium (—1) der retrograden Degeneration 24 Std nach Rhizo- und Neurotomie. Initiale Tigrolyse und Mitochondrienkonzentration in der näheren Umgebung des Zellkerns (s. Pfeile). Nissl-Schollen (*nis*), Mitochondrien (*mi*), Pigmentgranula (*pg*), markhaltige Nervenfasern (*nf*), Satellitenhülle (*sz*), Kapillare (*kp*).

Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 2000 ×

nommen werden. Auf Grund der Verschiedenheit von Objekt und Methode ist allerdings ein direkter Vergleich der Reaktionsformen nicht immer sicher durchzuführen.

BODIAN und MELLORS unterscheiden „frühe Chromatolysen“ = (—1), „mäßige Chromatolysen“ = (—2) und „schwere Chromatolysen“ = (—3). In der Repara-

tionsphase des chromatolytischen Prozesses werden die Stadien (—2) und (—1) in umgekehrter Richtung bis zur vollständigen Restitution der Strukturverhältnisse wieder durchlaufen.

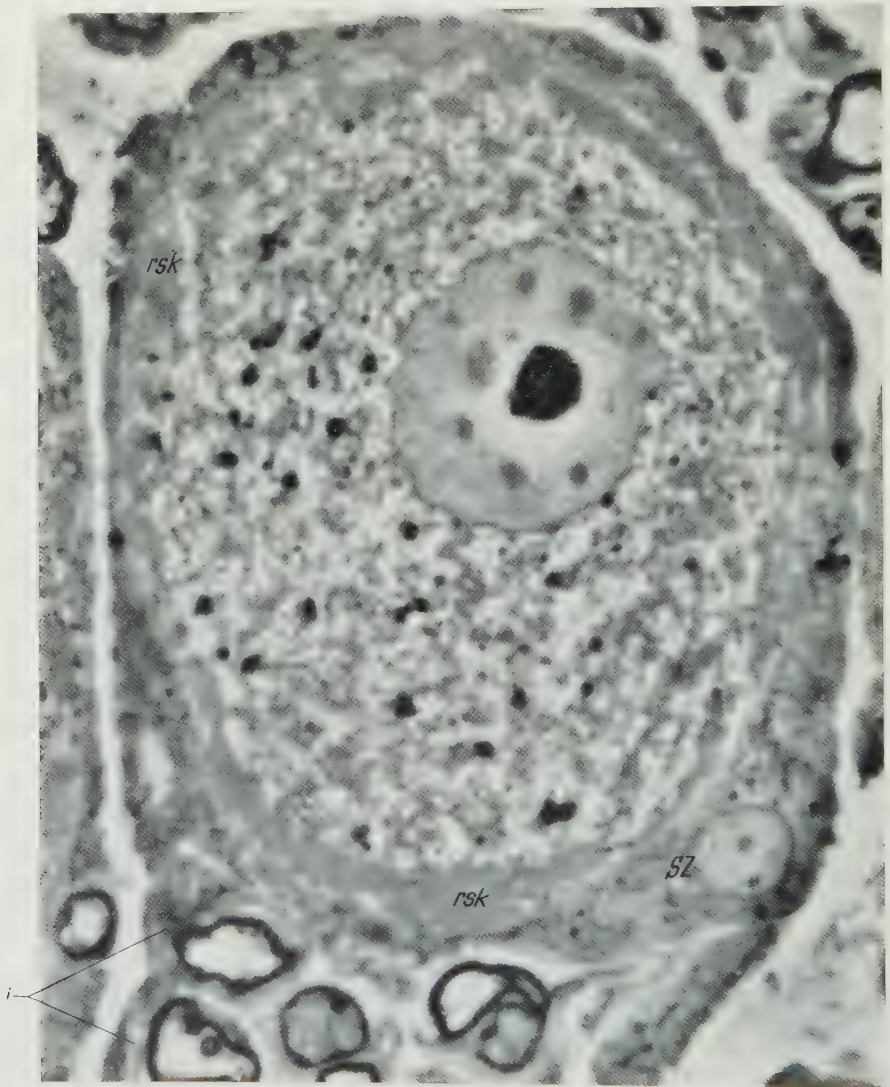


Abb. 2. Perikaryon vom Typ A, aus Spinalganglion L VI der Ratte im Stadium (—2) der retrograden Degeneration 3 Tage nach Rhizo- und Neurotomic. Mäßige Tigrolyse im Innenbereich des Nervenzellkörpers, Ausbildung des Randschollenkranzes (*rsk*). Der Zellkern zeigt eine stark gefaltete Oberfläche und liegt bereits angedeutet exzentrisch. Die Satellitenhülle (*sz*) erscheint etwas verdickt und kontrastreicher als normal. Initialglomerulum (*i*). Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme.

Vergr. 2000 ×

In meinen osmiumtetroxydfixierten Präparaten waren bereits 24 Std post operationem in einer größeren Anzahl der Perikarya mit dem Phasenkontrastmikroskop frühe bzw. „leichte Chromatolysen“ = (—1) zu beobachten (Abb. 1).

In den betroffenen Zellen ist in der näheren Umgebung des Zellkernes eine Auflockerung der Tigriod-Zeichnung eingetreten, gleichzeitig haben sich in diesem Gebiet Mitochondrien konzentriert.

Zwei Tage später zeigen zahlreiche Perikarya das Bild der „mäßigen Chromatolyse“ = (—2) (Abb. 2). In diesem Stadium ist ein wesentlicher Anteil der Nissl-Substanz in einer 4–7 μ breiten Randzone (Randschollenkranz) zusammengesintert, während in der Zellmitte zwischen kleinen Rest-Schollen verteilt Mitochondrien und Pigmentkörnchen liegen. Der Zellkern besitzt abgesehen von einer meist verstärkten Oberflächenfaltung noch die normale ovale bis runde Form. Er nimmt zwar schon seine exzentrische Stellung innerhalb der Zelle ein, liegt aber noch zentral vom Randschollenkranz. Nach kombinierter Rhizo- und Neurotomie treten neben dem Stadium (—2) vereinzelt auch „schwere Chromatolyse“ = (—3) in Erscheinung. An den folgenden Tagen nimmt dann die Anzahl der Perikarya, die diese ausgeprägte Degenerationsform zeigen, stetig zu und erreicht nach 8–10 Tagen mit 30% der Ganglienzellen das Maximum. Wie aus den Abb. 3 und 4 hervorgeht, ist der Zellkörper im Stadium (—3) gebläht und abgerundet. Der Satellitenmantel hat sich durch Proliferation und Schwellung der Gliazysten erheblich verdickt. Im Inneren der Perikarya liegen nun in großen Massen Mitochondrien und mehr oder minder reichlich Pigmentgranula. Der Zellkern nimmt die extrem exzentrische Lage innerhalb der randständigen Nissl-Substanz ein. Seine Membran ist gegen die Zellmitte hin meist abgeflacht und stark gefaltet. Der Nukleolus erscheint im Vergleich mit normalen Zellen leicht vergrößert und kontrastreicher.

Im weiteren Verlauf der retrograden Degeneration kommt es zu einer gewissen Konsolidierung der Verhältnisse. Dabei geht die initiale Zytoplasmасhwel lung des Perikaryons und der Satellitenzellen zurück, so daß es zu einer Verdichtung der Zellorganellen in der Ganglienzelle sowie zur Konzentration der Zellkerne des Initialglomerulums kommt (Abb. 5).

Neben den beschriebenen typischen Chromatolyse-Stadien, die heute allgemein als Ausdruck regenerativer Vorgänge in den Nervenzellen angesehen werden, treten in einzelnen Perikarya zusätzliche Strukturveränderungen auf, die sicher regressiver Natur sind. Diese Zellalterationen zeichnen sich aus durch vakuoläre Mitochondrientransformation, schaumige Umwandlung des Randschollenkranzes sowie durch zytolytische Erscheinungen. Der Zellkern ist meist stark gebläht, enthält aber ein offensichtlich zusammengeschrumpftes Kernkörperchen. Nicht selten finden sich im Karyoplasma grobe Chromatinschollen. Die Satellitenhülle bildet nur einen schmalen, kontrastreichen Saum (Abb. 6). Da ähnliche Strukturveränderungen in toxisch geschädigten Ganglienzellen auftreten können (ANDRES 1961b), möchte ich dieses regressive Degenerationsstadium „toxische Chromatolyse“ = (—4) nennen.

Als Beispiele der Reaktionsstadien wurden bisher ausschließlich Perikarya der *Typengruppe A* (vgl. ANDRES 1961a) herangezogen, da deutliche chromatolytische Veränderungen nach kombinierter Neuro- und Rhizotomie in 85–90% der A-Perikarya auftreten. Auffallend wenig reagieren dagegen die Perikarya der *Typengruppe B*. So zeigen nach der kombinierten Axotomie nur 15% dieser Zellen typische Zeichen der „primären Reizung“. Nach alleiniger Ischiadicotomie sind von ihnen nur vereinzelte Exemplare von der Reaktion in typischer

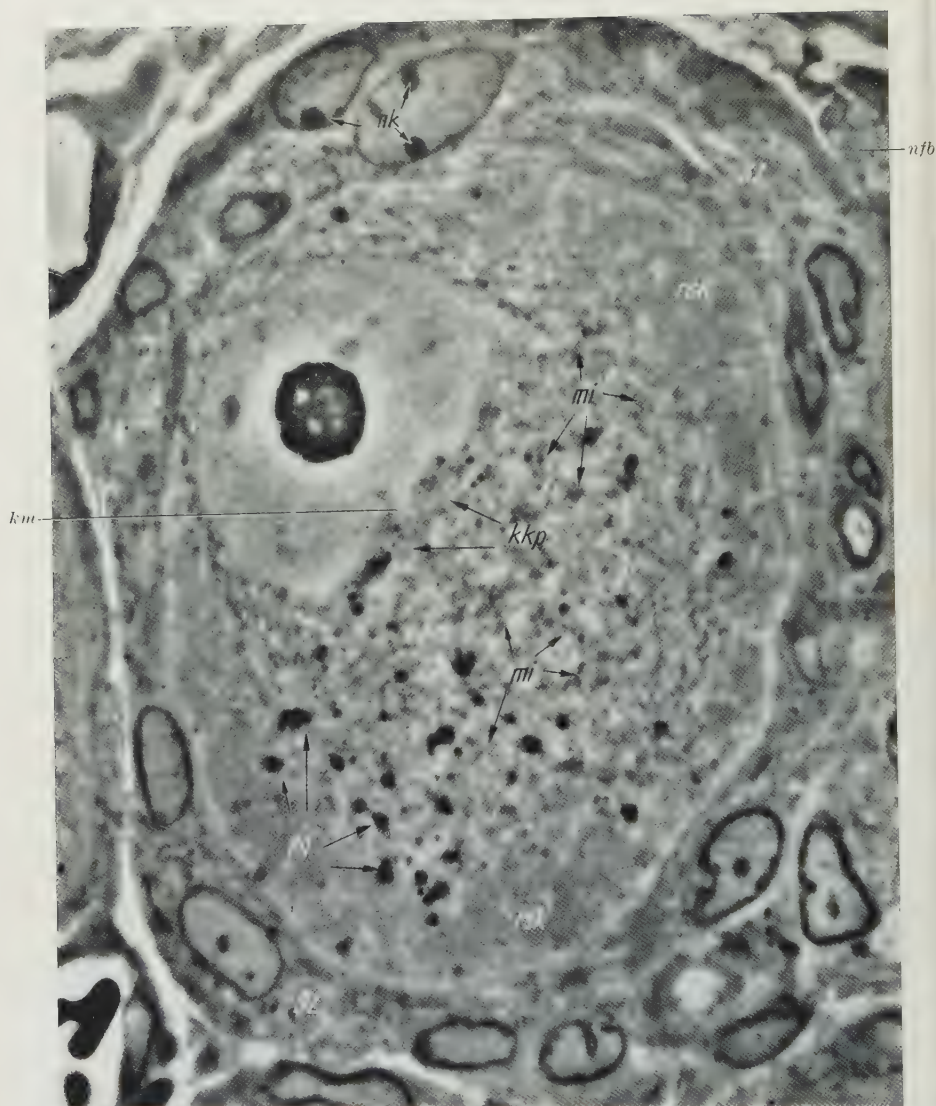


Abb. 3. Perikaryon vom Typ A, aus Spinalganglion L VI der Ratte im Stadium (—3) der retrograden Degeneration 11 Tage nach Rhizo- und Neurotomie. Abrundung der Außenkontur durch Zellödem. Im Gegensatz zur schweren Chromatolyse in der Mitte des Zellkörpers ist der Randschollenkranz (*rsk*) unverändert deutlich. Der zum Zellzentrum gerichtete faltenreiche Abschnitt der Kernoberfläche (*km*) trägt eine schmale Kernkappe (*kkp*). Der Nukleolus im extrem exzentrisch liegenden Zellkern ist offensichtlich vergrößert. Infolge partieller Frakturierung erscheinen die im Zellzentrum konzentrierten Mitochondrien (*mi*) mehr granulär als fadenförmig, von den kontrastreichen Pigmentkörnchen (*pg*) sind sie gut zu unterscheiden. Die Satellitenhülle (*sz*) ist jetzt erheblich verdickt. Die Mantelzellkerne zeigen tiefe Einziehungen der Kernmembran, randständige Verdichtung des Chromatins sowie vergrößerte Nukleoli (*nk*). Bündel regenerativer Fasern (*nfb*).

Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 2000 ×

Weise betroffen. Einschränkend muß aber hier gesagt werden, daß leichte und mäßige Stadien der „primären Reizung“ in den Perikarya vom Typ B insbesondere von Typ B₂ nur sehr unsicher diagnostiziert werden können, da in zahlreichen B-Zellen wie bei Nervenzellen des autonomen Systems Randschollen-

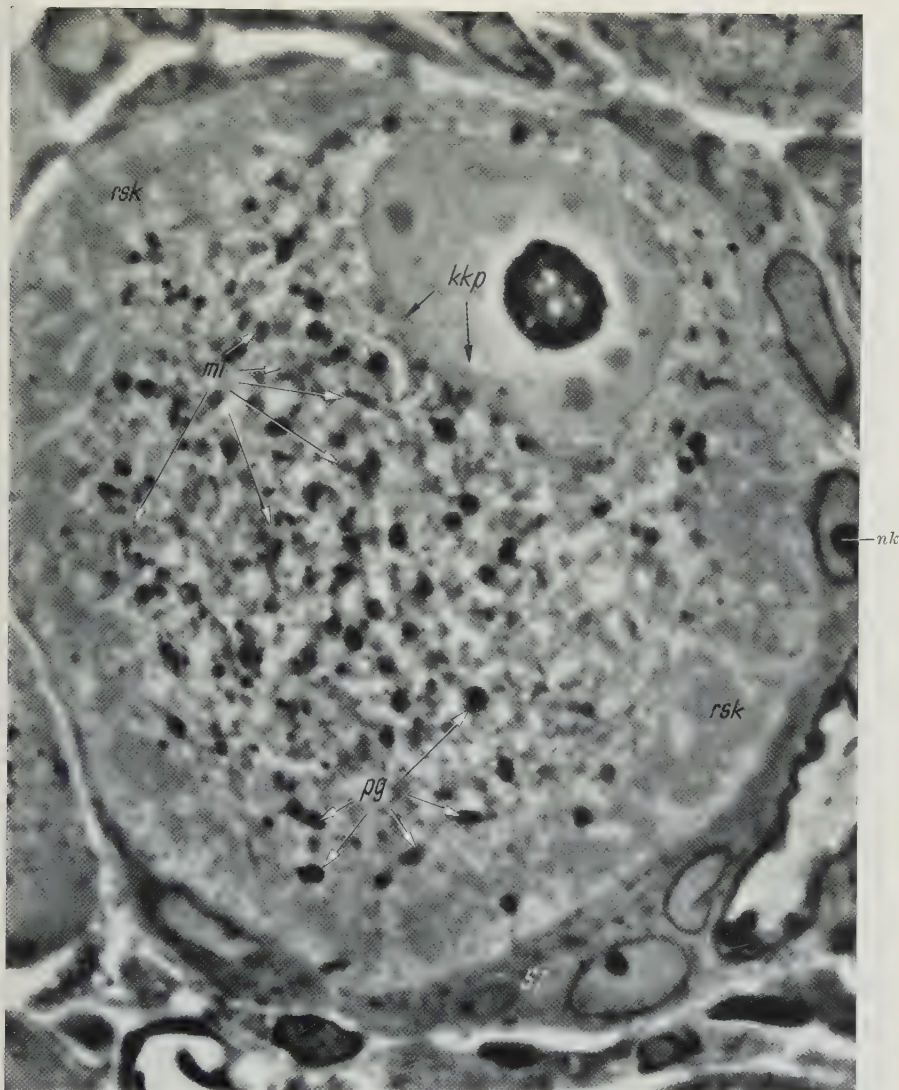


Abb. 4. Perikaryon vom Typ A, aus Spinalganglion L VI der Ratte im Stadium (—3) der retrograden Degeneration 11 Tage nach Rhizo- und Neurotomie. Der Zustand des Perikaryons entspricht etwa dem in Abb. 3. Die zahlreichen, stark vergrößerten Mitochondrien (*mi*), sind phasenkontrastoptysch nicht immer von den kontrastreichereren Pigmentkörnchen zu differenzieren. Bezeichnungen wie in Abb. 3. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 2000 \times

kranzbildungen der Nissl-Substanz zum normalen Erscheinungsbild gehören. Abb. 7 zeigt ein Perikaryon vom Typ B im Stadium (—2) bis (—3) der chromatolytischen Reaktion.

2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Feinstruktur

a) Nissl-Substanz. Deutliche Veränderungen in der Feinstruktur der Trigroid-Schollen erfolgen erst mit der Ausbildung des *Randschollenkranzes* im Stadium (—2) bis (—3). Dabei kommt es in dem 4—7 μ breiten Saum aus Nissl-Substanz

zu einer Reduktion und Verkleinerung des ergastoplasmatischen Retikulums sowie zu einem Verlust der typischen Parallelanordnung im Spaltensystem. Die



Abb. 5. Perikaryon vom Typ A, aus Spinalganglion L VI der Ratte im Stadium (—3) der retrograden Degeneration 22 Tage nach Rhizo- und Neurotomie. Durch Rückbildung des Zellödems in Perikaryon und Satellitenhülle kommt es zu einer relativen Verdichtung der Zellorganellen. Zahlreiche Einzellemente des Chondrioms (*mi*) sind hypertrophiert, daneben kontrastreichere Lipofuscingranula (*pg*). An der Zellperipherie ist es zu einer Vermehrung der Schwannschen Zellen gekommen, in ihrem Zytoplasma liegen kleinste Bündel regenerierender Nervenfasern (*nf*). Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 2000 \times

Ribosomen (RNS-Granula) neigen vermehrt zur Kondensation und bilden weniger häufig auf den Zisternenflachschnitten Ketten- und Spiralmuster. Häufiger treten aber auch an der Oberfläche der tangential im Schnitt getroffenen Ergastoplasma-Membranen Filamente und Granula kleinerer Größenordnung

(30—60 Å) in Erscheinung (Abb. 8 und 9). Ein ähnliches morphologisches Verhalten zeigen die noch im Zellzentrum verbliebenen Rest-Schollen.



Abb. 6. Perikaryon vom Typ A₁ aus Spinalganglion L VI der Ratte im Stadium (—4) der retrograden Degeneration 11 Tage nach Rhizo- und Neurotomie. Als Ausdruck einer „toxischen Chromatolyse“ erkennt man die schaumartige Umwandlung des Randschollenkranzes (*rsk*), die vakuoläre Mitochondrientransformation (*mi*) und die Blähung des Zellkernes. Beginnende Zytolyse (s. Pfeile), schmaler Satellitensaum (*sz*). Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 3000 ×

Im Stadium (—3) der retrograden Degeneration prägt sich dieses Bild noch stärker aus, bleibt aber sonst, zumindest in der Randzone im wesentlichen erhalten. Im Inneren der Perikarya kommt es dagegen meist zur vollständigen Disintegration der Tigroid-Schollen, so daß hier die Ribosomen, sofern sie nicht

aufgelöst werden, einzeln oder zu kleinen Gruppen gehäuft im Neuroplasma verteilt liegen (Abb. 12 und 13).

Eine Ausnahme von diesen Veränderungen machen die „Kernsieheln“ (KLEIST 1903) oder *Kernkappen*, die während der chromatolytischen Reaktion gerne der zur Zellmitte gerichteten Kernmembran aufsitzen. In ihnen bleibt

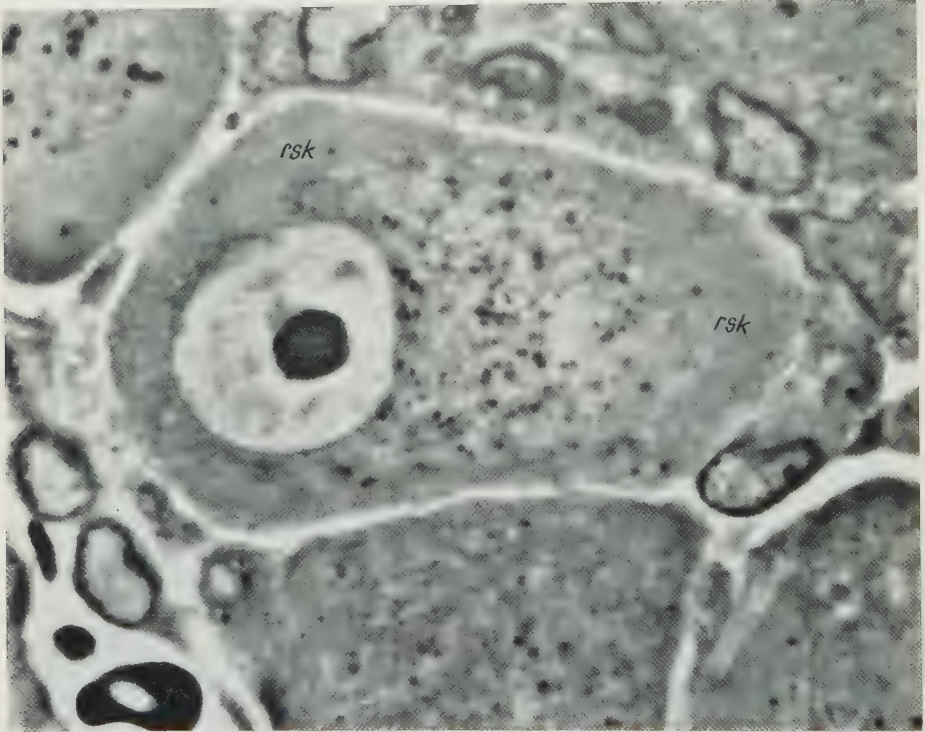


Abb. 7. Perikaryon vom Typ B₁ aus Spinalganglion L VI der Ratte im Stadium (—3) der retrograden Degeneration 11 Tage nach Rhizo- und Neurotomie. Die Veränderungen sind nicht ausgeprägt wie bei den Perikarya des Typus A. Es fehlt auch die intensive Reaktion der Satellitenhülle. Der breite Randschollenkranz (*rsk*) umschließt den exzentrisch gelegenen Kern und die in der Zellmitte gruppierten Mitochondrien und Pigmentkörnchen. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, Vergr. 2000 ×

interessanterweise in der Regel die parallele Orientierung der Ergastoplasma-spalten erhalten (Abb. 10).

Die „toxische Chromatolyse“ (—4) führt schließlich zur hochgradigen Aufblähung des ergastoplasmatischen Kanälchennetzes der randständigen Nissl-Substanz und gelegentlich auch zu den lytischen Erscheinungen, wie sie von mir an nekrobiotisch veränderten Ganglienzellen beobachtet werden konnten (ANDRES 1961 b). Vorstufen der „toxischen Chromatolyse“ mit mäßiger Erweiterung des Kanälchensystems treten häufiger auf. Sie sind phasenkontrastoptisch aber nicht zu erkennen (Abb. 11).

Eine Abgrenzung des Stadiums (—4) gegen präparatorisch verursachte Artefakte in chromatolytischen Zellen ist nicht immer einfach. Wichtig ist bei der Beurteilung das Aussehen der Ganglienzell- und Gliazystenkerne. So lösen artifizielle Schädigungen zuerst in den Satellitenkernen eine grobschollige Ausfällung

des Chromatins aus, während das Karyoplasma in den Ganglienzellkernen meist noch feinkörnig bleibt. Im Verlauf der „toxischen Chromatolyse“ behalten die Mantelzellkerne das für die „primäre Reizung“ charakteristische Aussehen, der Kern der Nervenzelle zeigt dagegen das Bild einer groben Ausflockung des Chromatins.

b) Neurofilamente und Neuroplasma. MARINESCO (1904) und CAJAL (1928) stellten in retrograd veränderten Ganglienzellen nur einen geringgradigen Umbau der Neurofibrillen-Anordnung fest. Auch im Bereich der Ultrastruktur bleibt bei „leichten Chromatolysen“ der den Neurofibrillen entsprechende gerichtete Verlauf der Neurofilamente unverändert erhalten. Aber schon im Stadium (—2) kommt es infolge der Ausbildung des Randschollenkranzes teilweise zu einer Verdrängung der Filamente in die Zellmitte. Nach dieser Umlagerung bilden nun die Neurofilamente zwischen den Mitochondrien und den Resten der Nissl-Schollen im Zentrum des Perikaryons ein irreguläres Netzwerk (Abb. 8). Die Filamente tauchen dann im Verlauf der „schweren Chromatolyse“, vollständig in dem verdichteten, granulär und feinwabig strukturierten Neuroplasma unter (Abb. 12). Ob dieser Untergang durch eine wirkliche Auflösung der Fadenelemente oder durch eine Maskierung hervorgerufen wird, ist noch nicht zu entscheiden.

Zwei bis drei Wochen post operationem treten in den Ganglien vermehrt sog. „gefensterte Zellen“ in Erscheinung. Diese Perikarya enthalten eine oder auch mehrere große, vorwiegend innerhalb des Randschollenkranzes gelegene Vakuolen, in die kurze, wie Mikrovilli geformte Zytoplasmaausstülpungen hineinragen. Gefensterte Perikarya kommen bekanntlich auch in normalen Spinalganglien vor. Bei einem Teil dieser Befunde handelt es sich wahrscheinlich um Spätstadien solitärer chromatolytischer Prozesse, wie an dem von mir abgebildeten Beispiel zu erkennen ist (vgl. ANDRES 1961a).

c) Mitochondrien. Die Aussagen über das topographische Verhalten des Chondrioms während der chromatolytischen Reaktion, die ich bereits in der Darstellung der Übersichtsbefunde gemacht habe, entsprechen den an denselben Präparaten gemachten Beobachtungen im Elektronenmikroskop.

Eine normalerweise schon vorhandene Polymorphie des Chondrioms, die ich besonders in den Perikarya vom Typ A feststellen konnte (ANDRES 1961a), ist im Stadium (—2) und (—3) in verstärktem Maße ausgeprägt. Neben bis zu 1,5 und 2 μ großen plumpen Mitochondrien finden sich vielfach gewundene, oft sehr dünne Fäden mit Querdurchmessern von einigen hundert Millimikron, daneben auch häufig kürzere bizarre Formen und kleinste dicht strukturierte Elemente, die an die von ROULLIER und BERNHARD (1956) beschriebenen „Mikrobodies“ erinnern. Die Ausbildung der Cristae mitochondriales ist in der Regel sehr deutlich (Abb. 12 und 13). Mit zunehmender Zeit nach der Axotomie scheint die Anzahl der großen mehr abgerundet konfigurierten Mitochondrien reichlicher zu werden. Doch trifft man sehr große Exemplare häufig auch schon in leichten und mäßigen Frühstadien der Chromatolyse an. In solchen Fällen dürfte es sich um jene Perikarya vom Typ A handeln, die schon normalerweise zahlreiche große Mitochondrien haben.

Die häufiger diskutierte Frage, ob es während der retrograden Degeneration in Nervenzellen zu einer Vermehrung der Mitochondrien kommt, scheint mir

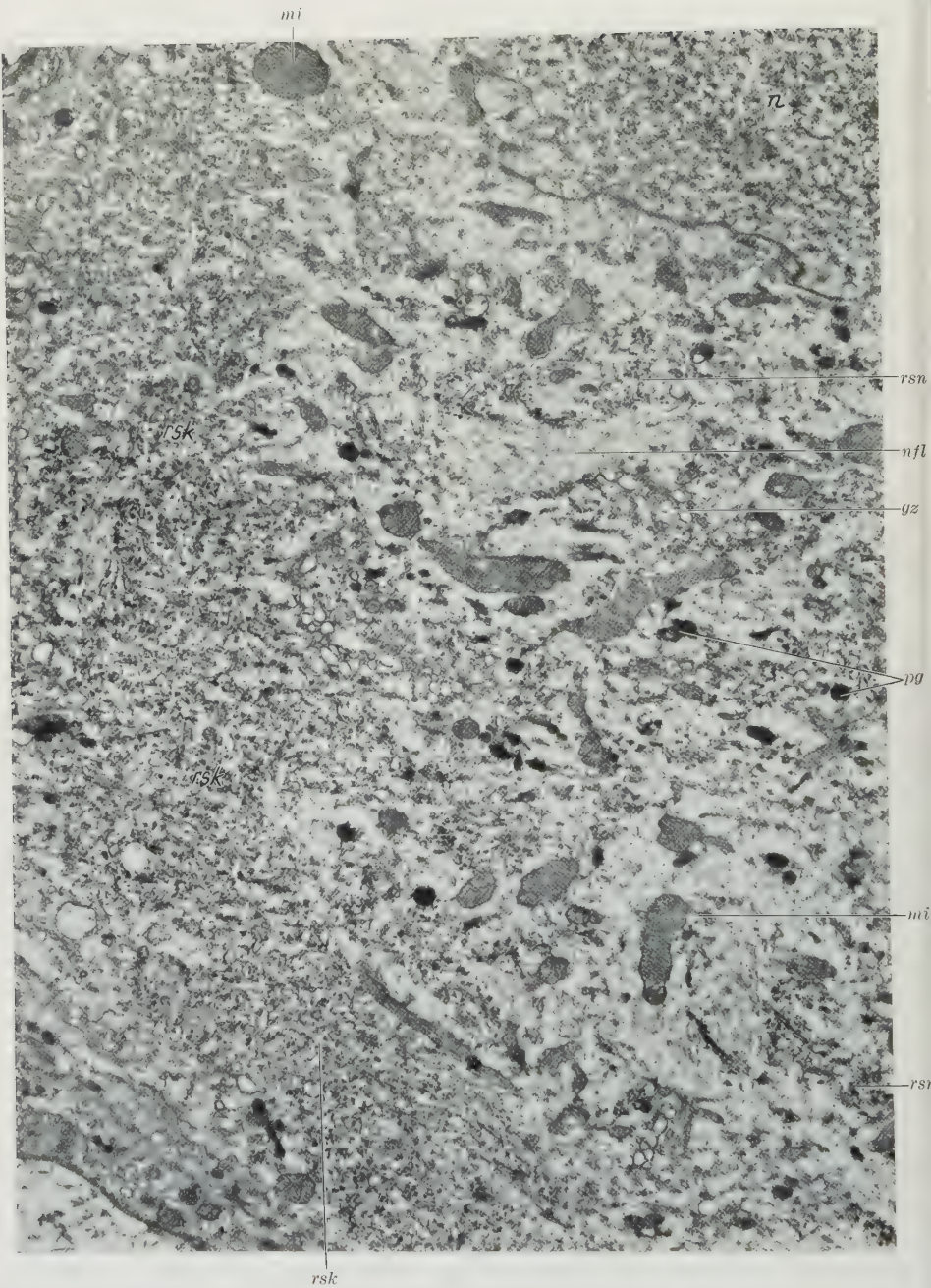


Abb. 8. Ausschnitt aus einem sensiblen Perikaryon vom Typ A₁ der Ratte im Stadium (—2) bis (—3) der retrograden Degeneration 6 Tage nach Rhizo- und Neurotomie. Die Nissl-Substanz ist überwiegend randständig (*rsk*). Daneben finden sich aber auch noch Restschollen (*rsn*) im Zellzentrum zwischen großen Mitochondrien (*mi*) und meist vakuolär veränderten Golgi-Zonen (*gz*). Die Pigmentkörnerchen (*pg*) sind relativ klein. Neurofilamente liegen in regelmäßiger netzartiger Anordnung (*nfl*). Links unten und oben Anschnitt der Satellitenhülle, oben rechts Zellkern mit faltiger Kernmembran.

Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 8200 ×

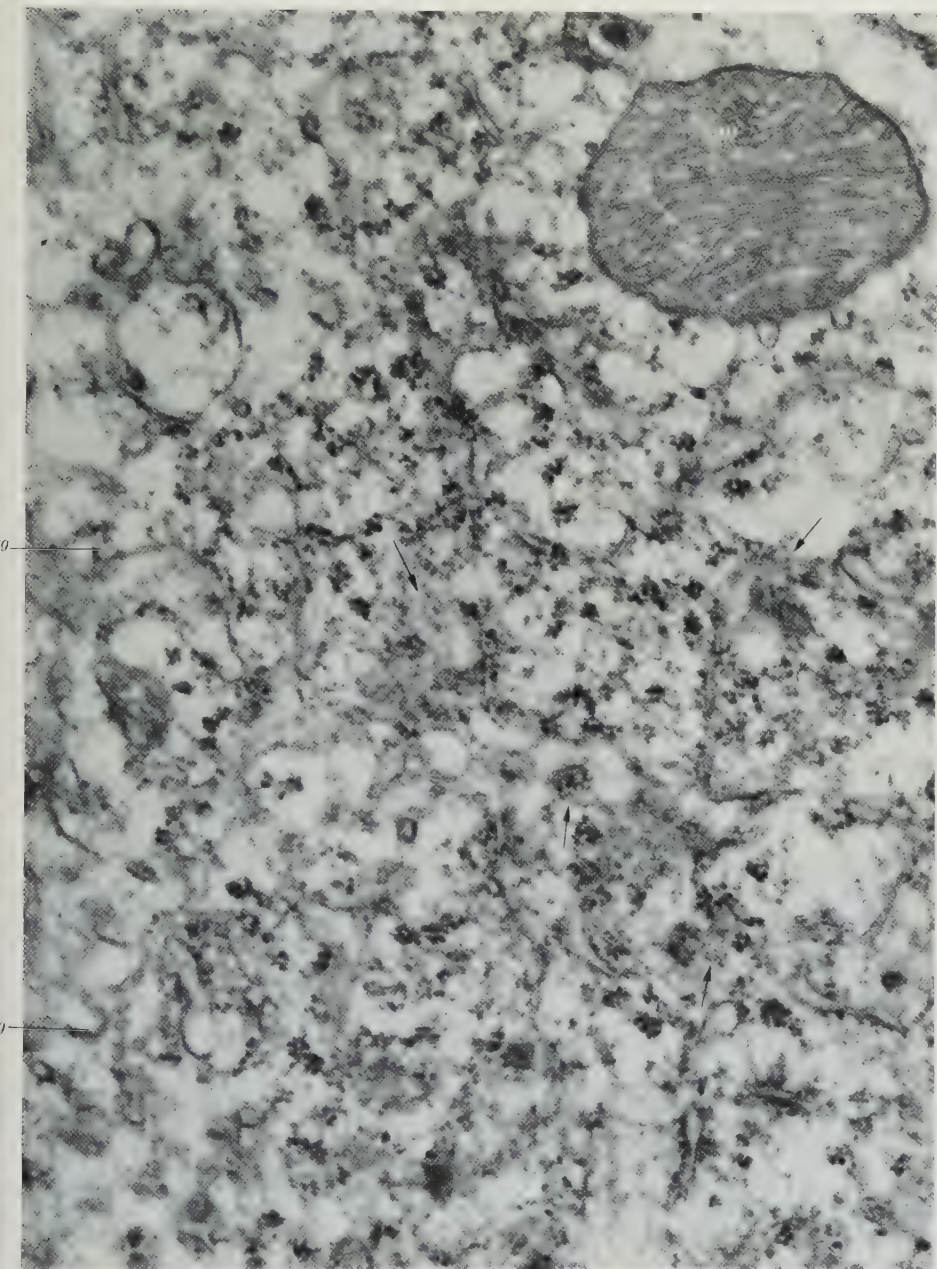


Abb. 9. Ausschnitt aus Abb. 8. Die stärkere Vergrößerung zeigt die Disintegration der Nissl-Substanz im Bereich des Randschollenkranzes mit Reduktion des ergastoplasmatischen Retikulums sowie Verlust der Parallelorientierung der Spalten. Die Ribosomen (RNS-Granula) sind meist gruppenweise kondensiert. An der Oberfläche tangential getroffener Ergastoplasamembranen erkennt man vermehrt Granula und Filamente kleinster Größenordnung (s. Pfeile). Die Grenze zwischen Satellit und Perikaryon ist tief verzahnt (*szg*). Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 33000 >

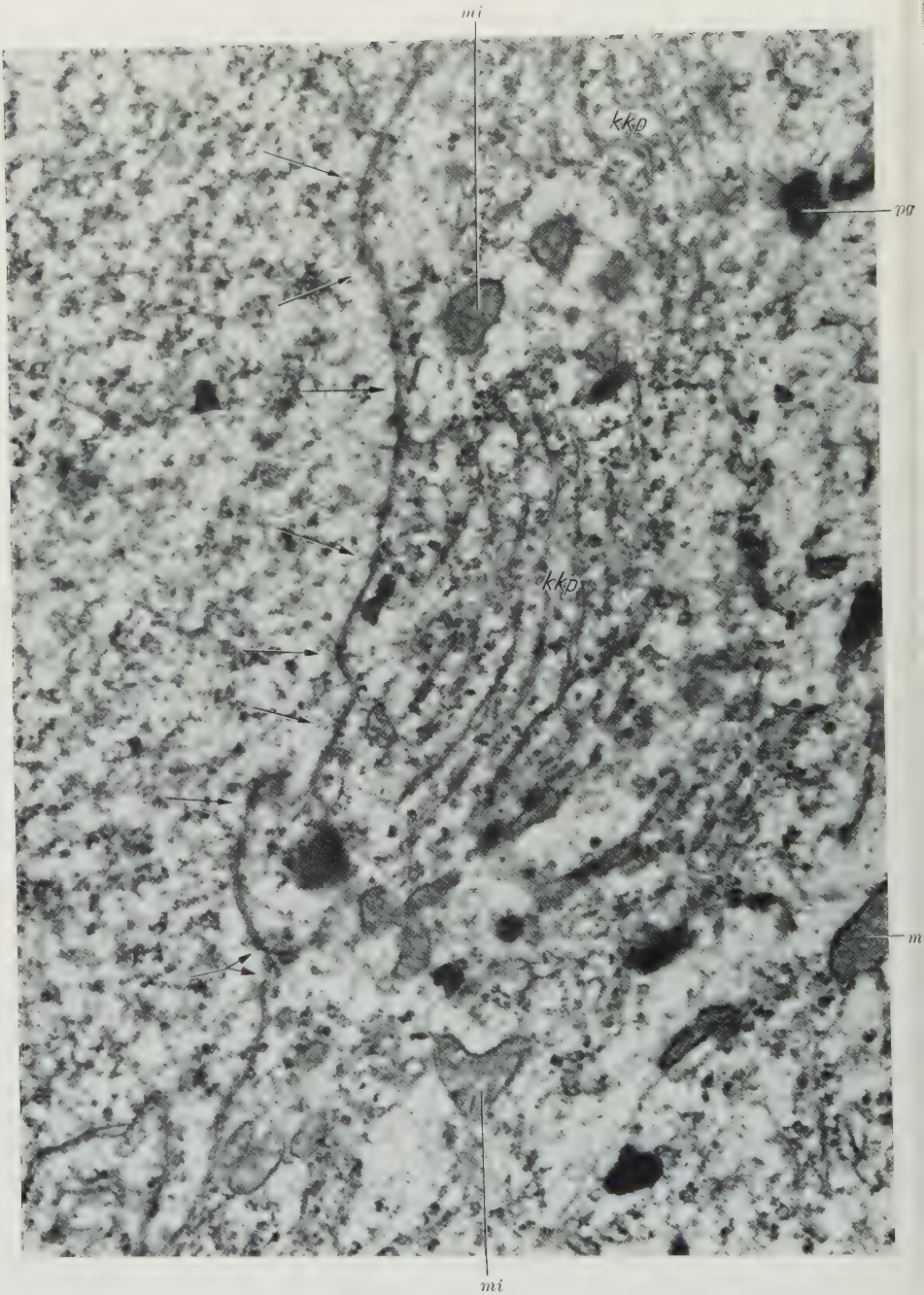


Abb. 10. Ausschnitt aus einem retrograd degenerierten sensiblen Perikaryon vom Typ A, 6 Tage nach Rhizo- und Neurotomie. Im Gebiet der Kernkappe (*kkp*) ist die parallele Anordnung der Ergastoplasmaspalten im Gegensatz zum Randschollenkranz besonders gut ausgeprägt. Links Kern mit Kernmembranporen (s. Pfeile), Mitochondrien (*mi*), Pigmentkörnchen (*pg*). Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 20000 \times

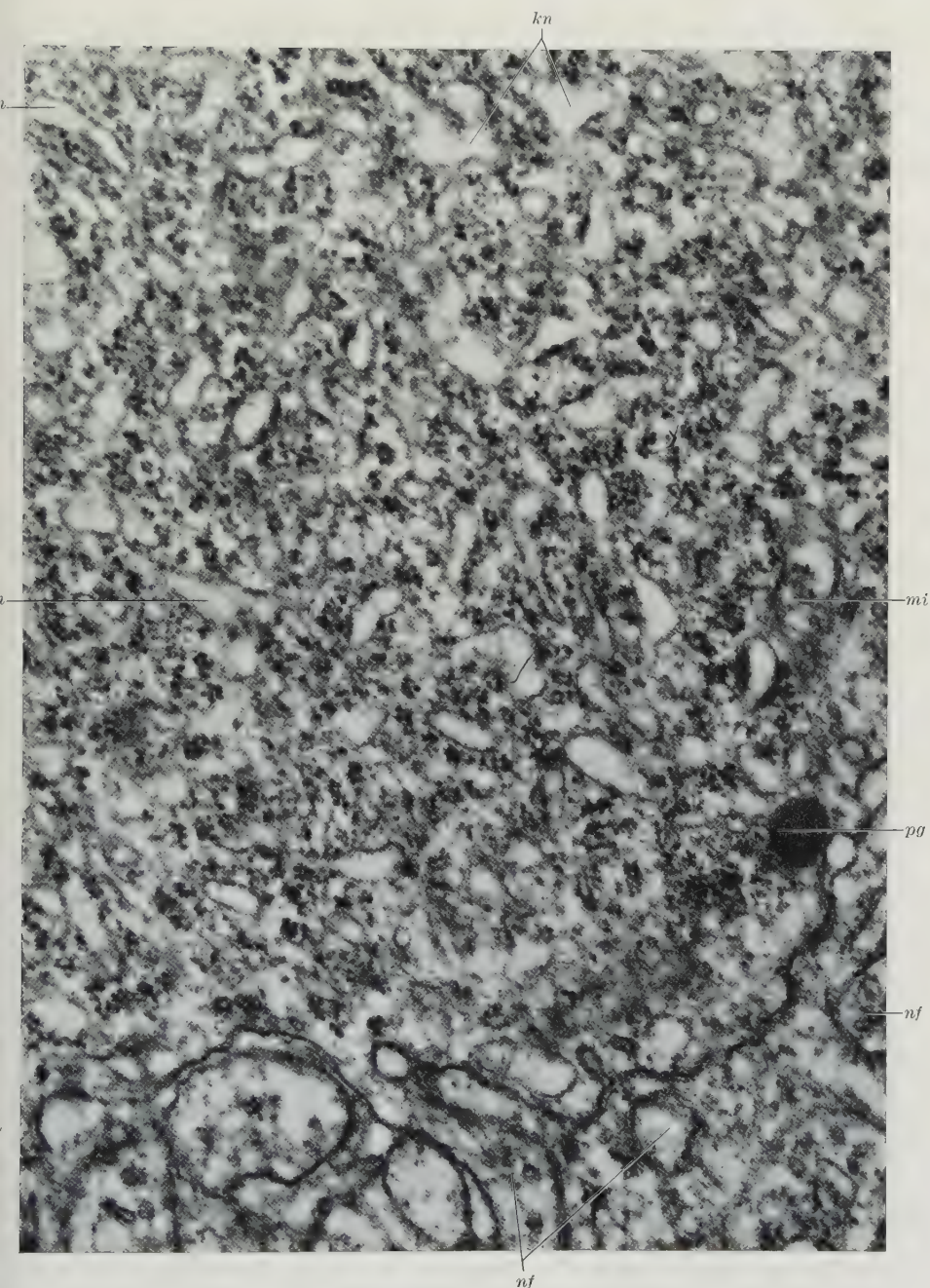


Abb. 11. Ausschnitt aus dem Randschollenkranz eines sensiblen Perikaryons vom Typ B₁ im Stadium (—3) der retrograden Degeneration 15 Tage nach Rhizo- und Neurotomie. Erweiterung des ergastoplasmatischen Kanälchennetzes im Bereich des Randschollenkranzes (*kn*) und angedeutete vakuoläre Mitochondrientransformation (*mi*) dürften Anzeichen einer beginnenden autotoxischen Zellschädigung sein. Unten Satellitenzelle mit paraphytenartigen Nervenzellfortsätzen (*nf*).

Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 32000 ×

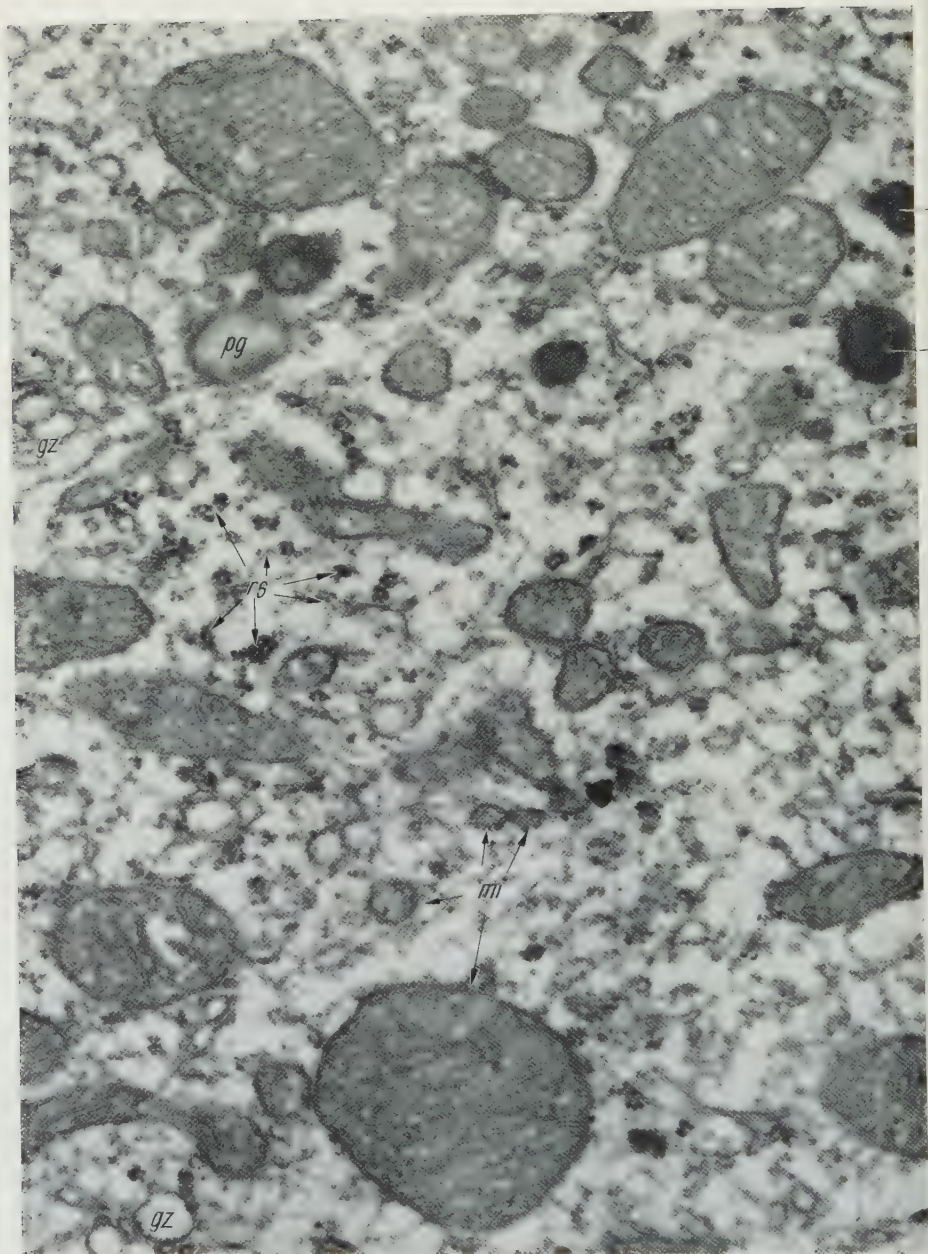


Abb. 12. Ausschnitt aus der Mitte einer sensiblen Ganglienzelle vom Typ A, im Stadium (-3) der retrograden Degeneration 12 Tage nach Rhizo- und Neurotomie. In dem jetzt wabig-granulär strukturierten Neuroplasma liegen Ribosomengruppen (*rs*), Mitochondrien (*mi*), Pigmentkörnchen (*pg*) und Reste von Golgi-Komplexen (*gz*) regellos verteilt. Die Cristae-Zeichnung in den größeren Mitochondrien ist in der Regel besonders deutlich. Neurofilamente sind nicht mehr zu erkennen.

Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 32000 \times

nach meinen Ergebnissen nicht ganz richtig gestellt zu sein, da ein Auszählen der polymorphen, oft sogar verzweigten und verschieden großen Gebilde, kaum einen

praktischen Wert hätte. Vielmehr dürfte für die Funktion und die Aktivität des Chondrioms eine Veränderung der Gesamtmasse und der Oberfläche von Bedeutung sein. Dieses scheint nun beides im Stadium (—3) der chromatolytischen Reaktion einzutreten. Daneben kommt es wahrscheinlich infolge einer Frakturierung der Fäden auch zu einer Vermehrung der Einzelelemente.

Nach länger bestehenden Tigrolysen entwickeln sich in einer Anzahl der großen Mitochondrien cristaefreie verdichtete Zonen, in denen nach und nach immer mehr kontrastreiche Granula und Schollen auftreten. Diese Formen sind vermutlich Partikel, die sich in Pigmentkörnchen, d. h. in diesem Fall in Lipofuscingranula umwandeln (Abb. 14). Wahrscheinlich transformieren auch kleine Elemente des Chondrioms in gelbes Pigment.

Eine besondere Umwandlungsform von Mitochondrien stellen Partikel dar, die aus unregelmäßig zwiebelschalenartig angeordneten osmiophilen Lamellen aufgebaut sind (Abb. 15). Solche Formen sind in schwer pathobiotisch veränderten Perikarya besonders häufig (ANDRES 1960).

Im Stadium der „toxischen Chromatolyse“ kommt es im Chondriom zu einer generellen degenerativen vakuolären Transformation und damit zu Bildern, die, wie bereits berichtet, auch nach mechanischer und toxischer Zellschädigung sowie nach akuter Anoxie in sensiblen Ganglienzellen entstehen.

d) Pigmentkörnchen. Morphologische Veränderungen in der Ultrastruktur der Lipofuscingranula waren in den Chromatolyse-Stadien (—1) bis (—3) nicht evident, nur bei der „toxischen Chromatolyse“ werden die Pigmentkörnchen in die lytischen Veränderungen einbezogen. Außer der Verlagerung der Lipofuscingranula in die Mitte des Zellkörpers kommt es im Verlaufe der retrograden Degeneration zur Pigmentzunahme durch die im letzten Abschnitt erwähnte Mitochondrientransformation. Möglicherweise beruht der von ORTMANN (1952) erbrachte Nachweis einer Lipoidanreicherung im tigrolytischen Zentrum von Vorderhornzellen auf der Vermehrung und Konzentration der osmiophilen Granula.

An dieser Stelle muß noch kurz auf eine Beobachtung hingewiesen werden, die ich zweimal in Perikarya mit „schwerer Chromatolyse“ gemacht habe. Es handelt sich um etwa $2,5\text{--}3\ \mu$ große schalen- oder ringartige, sehr kontrastreiche Körper, über deren Herkunft und Bedeutung noch keine Aussagen gemacht werden können (Abb. 13).

e) Golgi-Apparat. Nach Axondurchschneidungen sehen MARCORA (1908, 1910), CAJAL (1914, 1928) und PENFIELD (1920) in chromatolytischen Perikarya eine sehr frühzeitig eintretende Verlagerung der Golgi-Netze in die Zellperipherie. Dieser Vorgang wird heute allgemein mit PENFIELD als Retispersion bezeichnet. Bei meinen Untersuchungen zeigen die Golgi-Komplexe dagegen im Stadium (—1) der chromatolytischen Reaktion keinen signifikanten Umbau. Es bleibt hier noch zu prüfen, ob die lichtoptisch zu beobachtenden Golgi-Netze immer mit den elektronenmikroskopisch darstellbaren Golgi-Komplexen übereinstimmen. Die ersten elektronenmikroskopisch wahrzunehmenden Veränderungen in der Struktur der Golgi-Komplexe erscheinen im Verlauf der „mäßigen Chromatolyse“. Dabei kommt es vornehmlich zu einer Erweiterung des in den Komplexen zentral verdichteten Hohlraumsystems (Abb. 8). Während der schweren retrograden Degeneration erfolgt dann schließlich ein Zerfall der

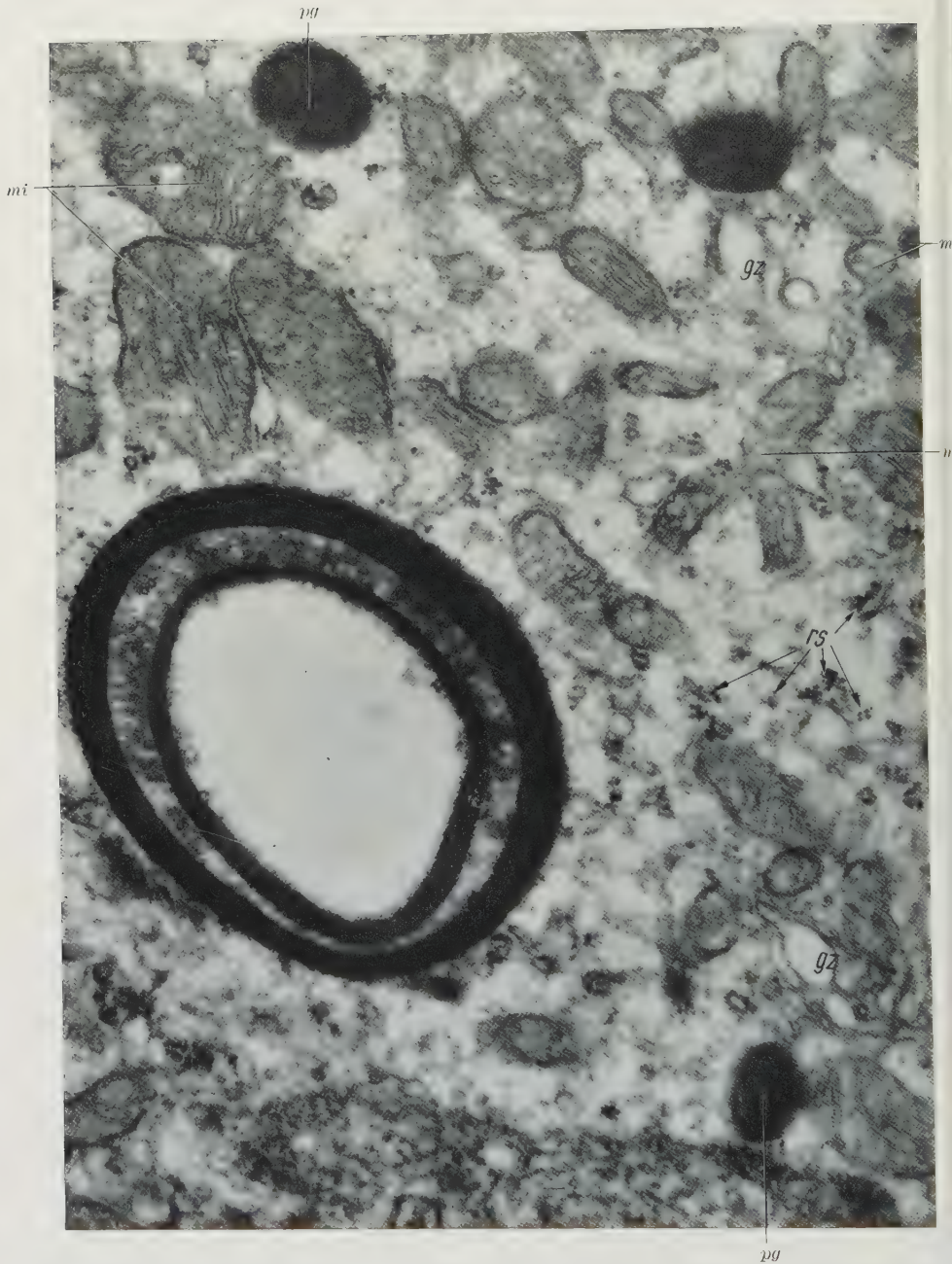


Abb. 13. Ausschnitt aus der Mitte einer sensiblen Ganglienzelle vom Typ A, im Stadium (—3) der retrograden Degeneration 15 Tage nach Rhizo- und Neurotomie. Konzentration der polymorphen Mitochondrien (*mi*), daneben Pigmentkörnchen (*pg*), Reste des Golgi-Apparates (*gz*) und Ribosomen (*rs*). Links unten großer ringartiger Einschuß unbekannter Herkunft. Unten Verdichtung feinfädig-granulären Materials, das im Aussehen an Bauelemente des Nukleolus von Ganglienzellen erinnert. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 32000 ×

Golgi-Areale in sehr viel kleinere Einheiten von etwa $0,4 \mu$ und weniger. Dieser Vorgang entspricht sehr gut der lichtoptisch bekannten Retisolution (PENFIELD

1920). Sichere Aussagen über das räumliche Verhalten der Golgi-Komplexe können allerdings erst nach Rekonstruktionen aus Schnittserien gemacht werden.

An den vakuolären Umwandlungen während der „toxischen Chromatolyse“ beteiligen sich die Rest-Komplexe des Golgi-Apparates nur noch unwesentlich.

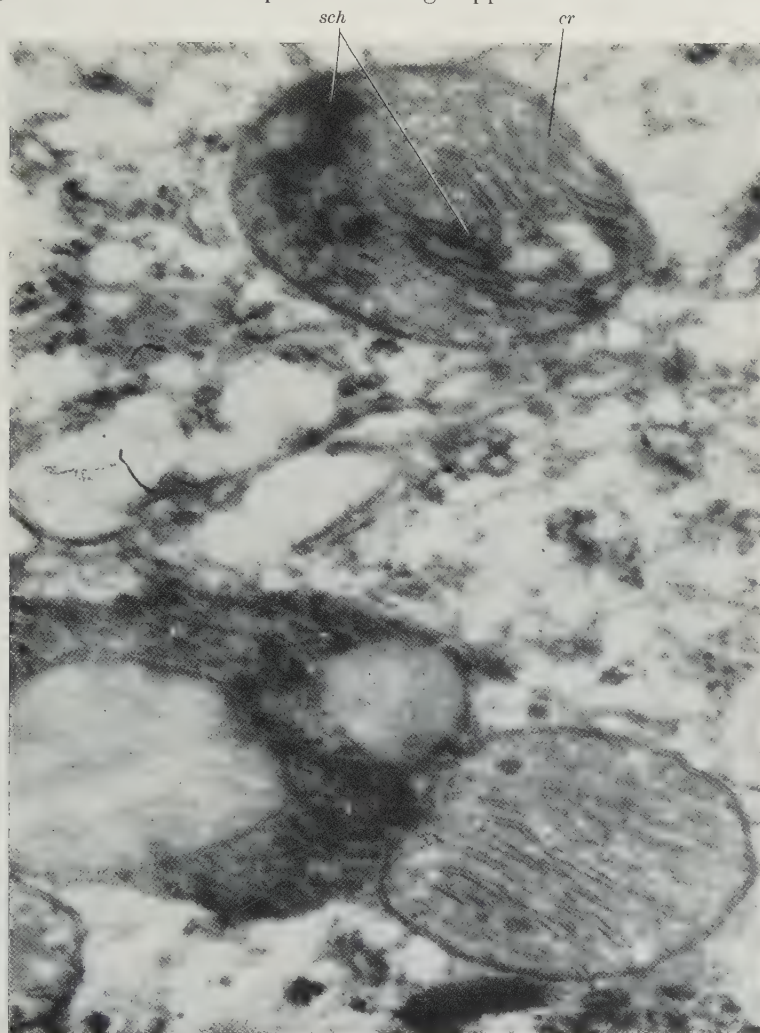


Abb. 14. Oben Mitochondrion aus einem retrograd degenerierten Perikaryon 15 Tage nach Rhizo- und Neurotomie. In der verdichteten Grundsubstanz erkennt man Reste der Cristae mitochondriales (*cr*) und besonders kontrastreiche Schollen (*sch*), die eine Zunahme osmiophiler Substanzen und eine Transformation in gelbes Pigment anzeigen. Unten größeres Lipofusceinkörnchen und normales Mitochondrion. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 50 000 \times

Infolge der Retisolution treten seine Elemente auch nicht in der typischen Weise im Phasenkontrastbild hervor, wie in autolytischen Perikarya normaler Ganglien nach akuter Anoxie (ANDRES 1961 b).

f) **Zellkern.** Der wohlbekannten topographischen Verlagerung sowie die Verformung des Zellkernes bei der „primären Reizung“ stehen im ultramikroskopischen Bereich nur sehr spärliche Veränderungen gegenüber, die vor allem den

Nukleolus und die Kernmembran betreffen. Die geringgradige Kernkörperchenvergrößerung ist begleitet von einer Vermehrung der granulären Komponente B des Nukleolus (vgl. ANDRES 1961a). Dagegen geht die oft größere Areale einnehmende Komponente C in der Ausdehnung etwas zurück. Größere Protuberanzen an der Oberfläche des Kernkörperchens werden im Stadium (—3) der chromatolytischen Reaktion sehr selten, andererseits können aber die Nukleolar-Zisternen leicht erweitert sein.

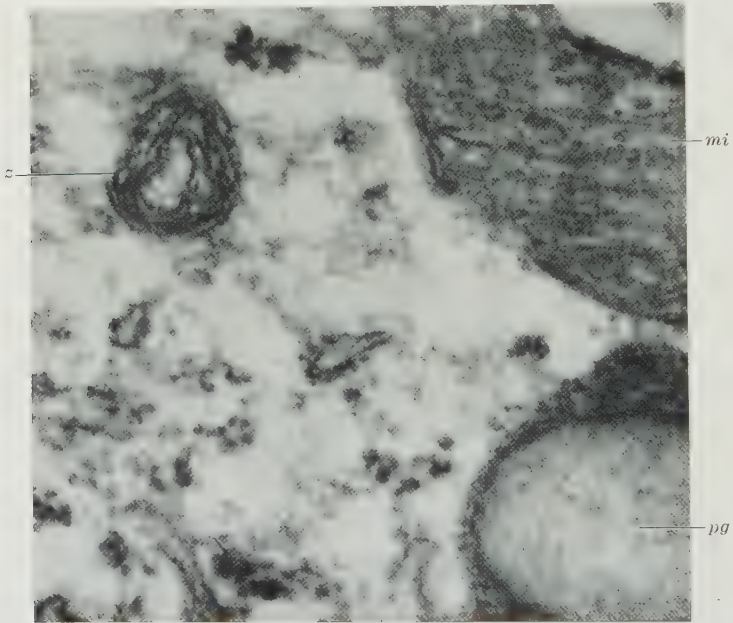


Abb. 15. Zytosom (z) mit unregelmäßig lamellärer Strukturzeichnung aus einem retrograd degenerierten sensiblen Perikaryon. Rechts Mitochondrion (mi), darunter Anschnitt eines Lipofuscin-Körnchens (pg) mit großer opaker Vakuole. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 75000 \times

Der gegen die Zellmitte und die Kernkappe gerichtete Kernmembranabschnitt zeigt im Bereich der tiefen Falten besonders deutlich ausgebildete Kernporen, die fast regelmäßig das im Zentrum des Porenringes gelegene Körnchen enthalten.

Völlig anders ist das Kernbild im Stadium (—4). Infolge der Kernblähung ist seine Oberfläche jetzt mehr oder weniger verstrichen, sein Membranspaltraum erscheint verengt oder kollabiert und die Poren sind nur noch als unscharfe Verdichtungen zu erkennen. Weiterhin kommt es zu einer erheblichen Verkleinerung und Verdichtung des Kernkörperchens und schließlich im Kernplasma zu einer generellen grobflockigen Zusammenballung der Karyosomen, die im phasenkontrastmikroskopischen Bild als Chromatinschollenbildung deutlich wird.

Gelegentlich treten im Neuroplasma schwer chromatolytischer Zellen unscharf begrenzte Anhäufungen feinfädig bis granulär strukturierten Materials auf, das an die Bauelemente des Kernkörperchens von Ganglienzellen erinnert (Abb. 13). Die Frage, ob es sich hierbei um ausgeschleuste Kernsubstanzen handelt, kann noch nicht beantwortet werden. Lichtmikroskopisch liegen an

Nervenzellen mehrere Beobachtungen über Ausstöße von Kernmaterial vor (KÖRNER 1937 b, PICARD und STAHL 1956). An Pankreas-Acinszellen konnte der Vorgang einer Extrusion von Kernmaterial auch elektronenmikroskopisch bestätigt werden (CLARK 1960). Trotzdem handelt es sich wohl bei den seltenen Befunden meiner Untersuchung kaum um regelmäßig ablaufende Funktionsbilder.

g) Satellitenhülle und Schwannsche Scheide. Die engen topographischen und funktionellen Beziehungen der Satellitenhülle zum Perikaryon machen es notwendig, abschließend auf Veränderungen einzugehen, die im Verlaufe der retrograden Reaktion in diesen Zellen entstehen. Auf die lichtmikroskopisch bekannte Zellproliferation und auf die Verdickung des Zellmantels wurde bereits bei der Darstellung der phasenkontrastmikroskopischen Befunde eingegangen.

Elektronenmikroskopisch fällt im Stadium (—2) und (—3) die außerordentlich innige Verzahnung der Satelliten-Perikaryozellgrenze auf. Paraphytäre Ausläufer der Zellen dringen gelegentlich $0,2\text{--}0,5\ \mu$ weit in das Zytoplasma der anderen Zelle ein (Abb. 16). Der Kontrast des Gliozytenplasmas nimmt während der chromatolytischen Reaktion des Perikaryons erheblich zu, gleichzeitig gehen die Ansammlungen der kleinen Vesikel an der zur Ganglienzelle gerichteten Zellmembran zurück, größere Vakuolen werden aber eher reichlicher. Die Kerne der Satellitenzellen reagieren mit tiefen Einziehungen der Oberfläche. Gleichzeitig kommt es zu einer Kondensation von Karyosomen an der Innenseite der Kernmembran und an den Nukleolen, die sich hierdurch auffallend vergrößern (Abb. 3 und 4). Kernkörperchenvergrößerungen während der retrograden Degeneration wurden von HYDÉN und REXED (1944) auch in der Schwannschen Scheide festgestellt.

Im Stadium der „toxischen Chromatolyse“ werden die Gliozyten ebenfalls auch von der Reaktion betroffen. Im Gegensatz zu den Perikarya, die teilweise unter lytischen Erscheinungen weiter anschwellen, kommt es in der Satellitenhülle zu einer Entquellung und weiteren Zytoplasmaverdichtung. Offensichtlich regressive Veränderungen wie in den Ganglienzellen treten in den Satellitenhüllen nicht auf.

Die Veränderungen der Nervenfasern in den Ganglien wurden in dieser Arbeit nicht systematisch untersucht. Es sei aber kurz auf ein paar Befunde eingegangen, die sich zum Teil noch im Bereich des Initialglomerulums abspielen.

Zwölf Tage nach der kombinierten Rhizo- und Neurotomie ist es in zahlreichen Fasern innerhalb des Spinalganglions zur Markballenbildung gekommen. Die Schwannschen Zellen sind dann mit größeren und kleineren Resorptionsvakuolen durchsetzt, deren Durchmesser minimal etwa $0,5\ \mu$ beträgt. BUNGE u. Mitarb. (1960) zeigen in operativ geschädigtem Rückenmark von Katzen ähnlich transformierte Elemente, die sie nach ihrem Aussehen „gitter cells“ nennen.

Im einzelnen erkennt man in den von einer einschichtigen Membran ausgekleideten Resorptionsvakuolen Markscheidenreste, die bei den größeren Markkugeln noch in der Mitte die typische Myelinschichtung besitzen (Abb. 17). Im Bereich der Fermentwirkung ist es an der Oberfläche der Markkugeln zu einer Frakturierung und Kontrastintensivierung der Myelinschichten gekommen. Ein dichtes, aber sehr heterogen strukturiertes Bild bietet das Zytoplasma zwischen den Vakuolen. Die relativ aufgelockert strukturierten Mitochondrien heben sich

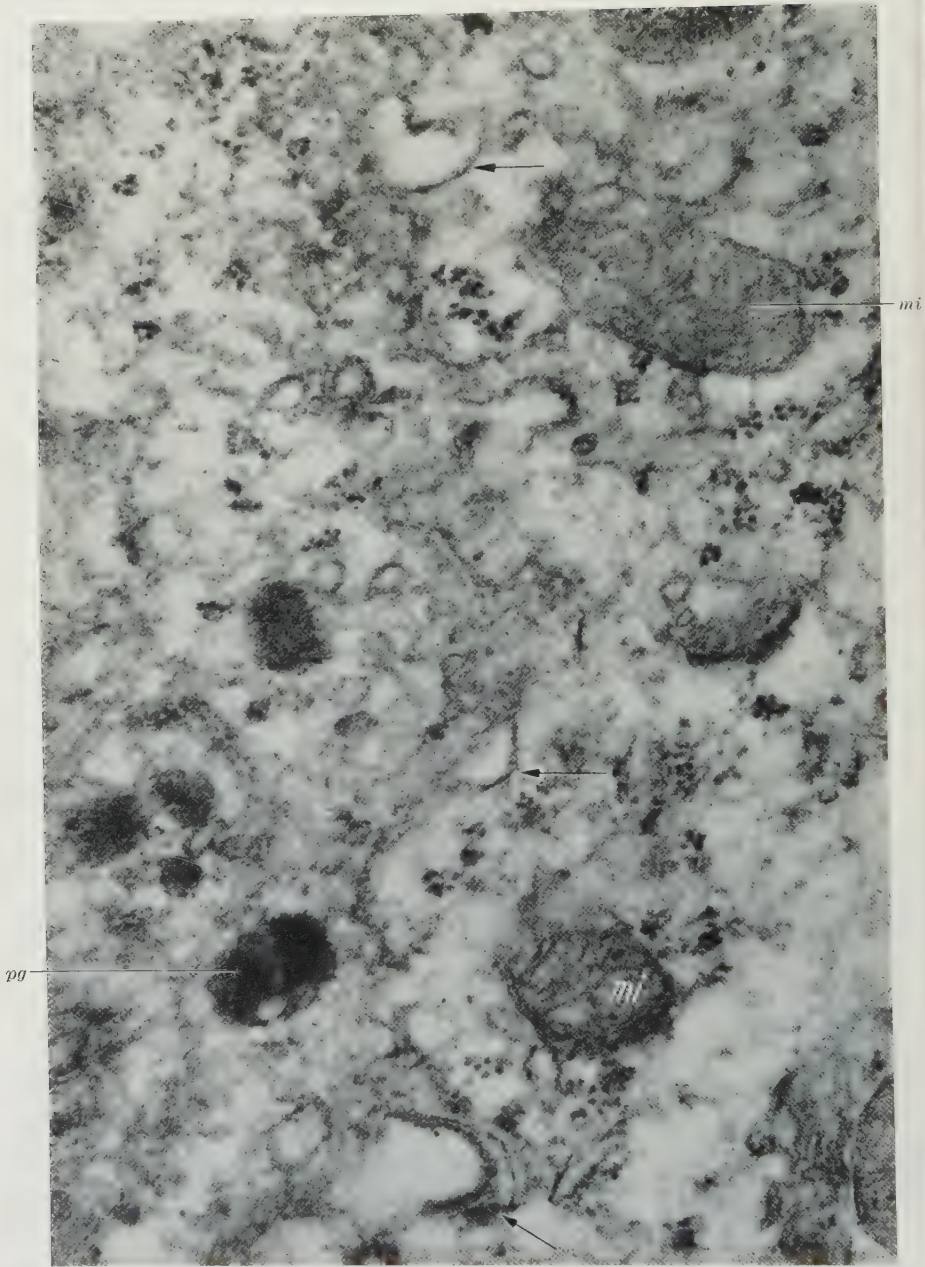


Abb. 16. Intensive Reaktion der Grenzmembranen (s. Pfeile) zwischen Perikaryon (rechts) und Satellitenzelle 3 Tage nach Rhizo- und Neurotomie. Die Membrankontur ist wegen der vielfältigen Verzählung streckenweise nicht mehr zu verfolgen. Pigmentkörnerchen (*pg*), Mitochondrien (*mi*). Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 40 000 \times

kaum von dem fein granulären, mit scholligen Verdichtungen durchsetzten Grundplasma ab. Ribosomen und ergastoplasmatisches Retikulum treten im Verlauf der Abbauphase in den Schwannschen Scheidenzellen in den Hintergrund.

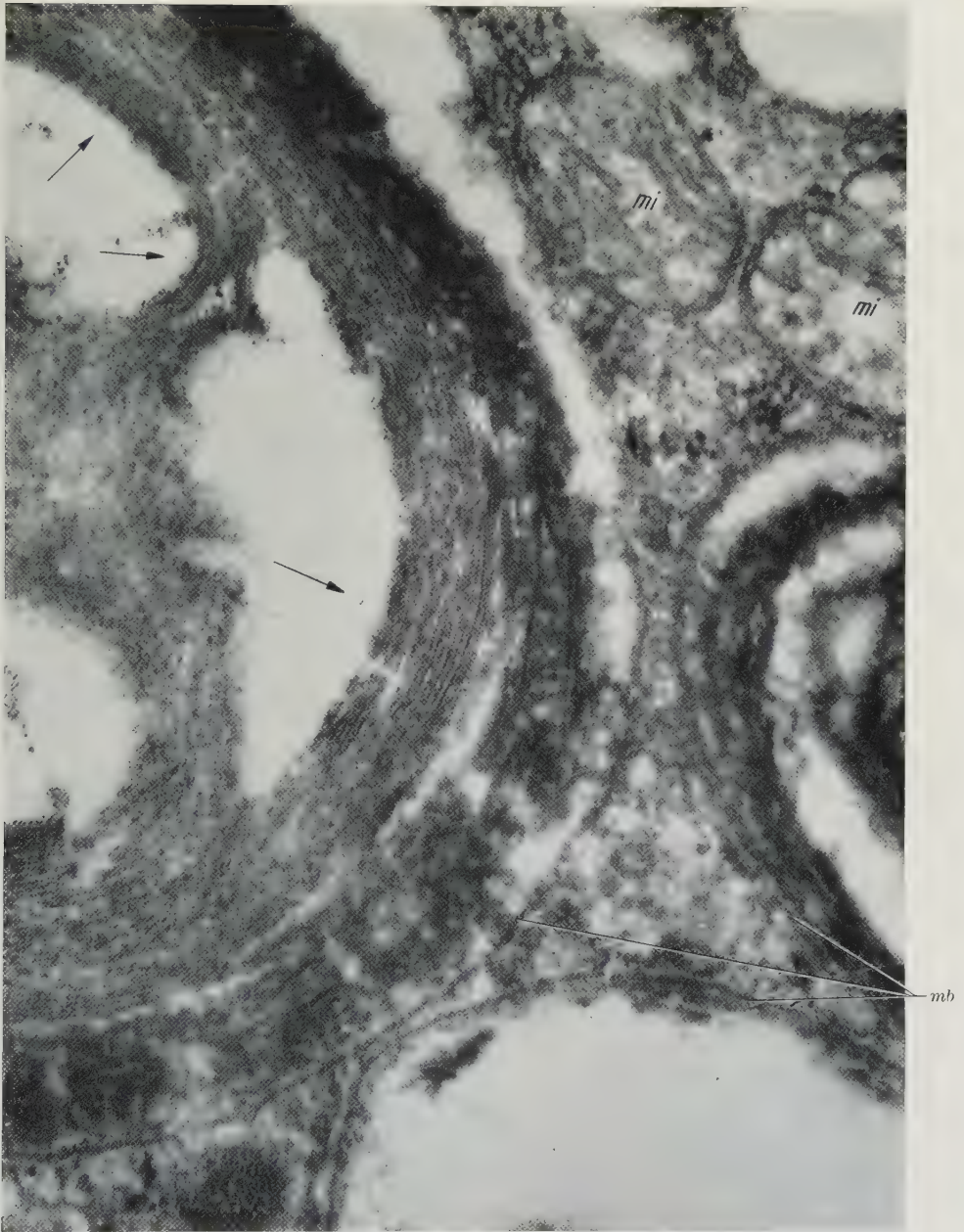


Abb. 17. Ausschnitt aus einer Schwannschen Zelle aus einem Spinalganglion der Ratte im Stadium der Markballenbildung 15 Tage nach Rhizo- und Neurotomie. Die größere Markkugel läßt zum Teil noch die typische Myelinschichtung (s. Pfeile) erkennen. Die der Fermenteinwirkung ausgesetzte äußere Zone erscheint kontrastreicher und frakturiert. Membran der Resorptionsvakuolen (*mb*), Mitochondrien (*mi*). Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 100 000 ×

Im Verein mit der Ausbildung der eben beschriebenen „Vakuolen-Zellen“ erscheinen in zunehmendem Maße Bündel regenerativer Fasern, die etwa 12 Tage post operationem mit Querdurchmessern von 10–30 μ einen recht

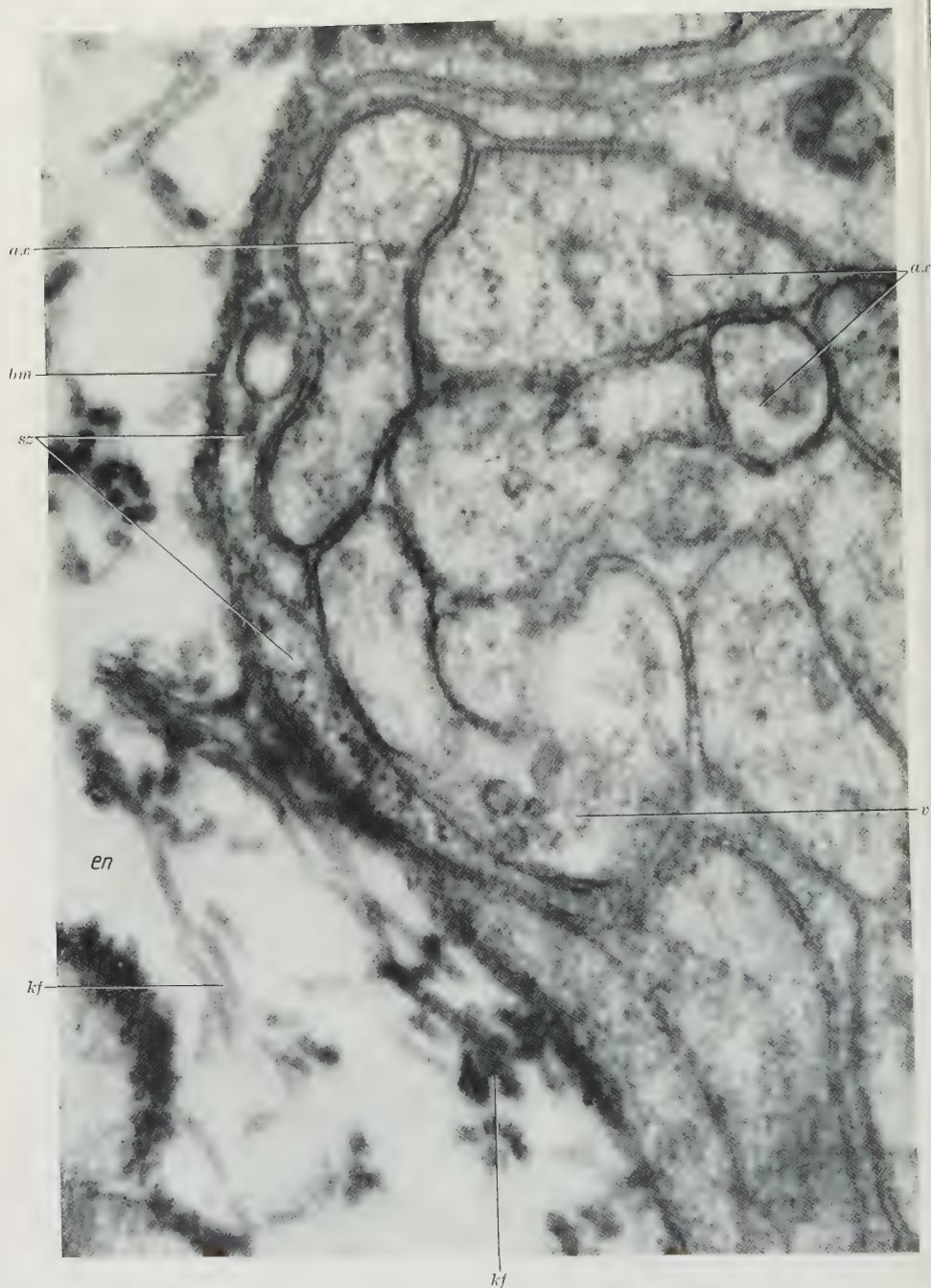


Abb. 18. Ausschnitt eines Bündels regenerierender Nervenfasern aus einem Spinalganglion der Ratte 15 Tage nach Rhizo- und Neurotomie. Die dicht gedrängt liegenden Axone (*ax*) sind in das Zytoplasma einer Schwannschen Zelle (*sz*) eingebettet. Gegen den Endoneuralspaltraum (*en*) ist das Faserbündel durch eine zarte Basalmembran (*bm*) abgegrenzt. Vesikel im Axoplasma (*v*), Kollagenfibrillen (*kf*).
Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 68 000 ×

beträchtlichen Umfang annehmen können. Regeneratorische Fasern treten auch in großer Zahl in den Endoneuralspalten zwischen den Perikarya auf. Wie in marklosen Faserbündeln, von denen sie im Einzelfall nicht immer sicher zu unterscheiden sind, liegen die Axone zumeist vollkommen in das Plasma von Schwannschen Zellen eingebettet. Auch eine gegen den Endoneuralraum gerichtete Basalmembran ist in der Regel schon angedeutet vorhanden. Die Kaliber der regenerierenden Axone schwanken zwischen 0,2 und 1,5 μ . Ihr Neuroplasma ist noch wenig differenziert. Es enthält neben kleineren Mitochondrien und Ansammlungen von 500—800 Å großen Vesikeln überwiegend feingranuläres Material. Neurofilamente sind nicht mit Sicherheit zu erkennen. Sie sind aber möglicherweise durch das dicht strukturierte Neuroplasma maskiert (Abb. 18).

IV. Diskussion

Wenn auch im Verlauf der retrograden Degeneration eine Beziehung zwischen dem Zeitraum nach der Axotomie und dem Grad der tigrolytischen Veränderungen in den Perikarya besteht, so kommen doch gleichzeitig immer mehrere Chromatolyse-Stadien nebeneinander vor. KLEIST (1903) machte hierauf bereits aufmerksam und hielt es für wahrscheinlich, daß die Ursache dieses Phänomens in Baudifferenzen der Neurone liege.

In der vorliegenden Arbeit ließ sich ein unterschiedliches Verhalten der A-Perikarya zu den B-Perikarya feststellen. Nach kombinierter Neuro- und Rhizotomie, bei der, abgesehen von den Relais-Zellen und den A₃-Neuronen der Einteilung von SCHARF (1958), sämtliche Ganglienzellen mindestens einen Zellfortsatz eingebüßt haben müssen, reagieren von den A-Perikarya 85—90%, dagegen von den Perikarya des Typus B, die immerhin in den untersuchten Spinalganglien mehr als die Hälfte der Nervenzellen ausmachen, nur etwa 15% mit ausgeprägten chromatolytischen Erscheinungen. Es erhebt sich deshalb die Frage, ob der Verlust eines der oft sehr dünnen marklosen Zellfortsätze im B-Perikaryon immer eine ausgeprägte Tigrolyse auslöst. Vielleicht sind die B-Zellen als mutmaßliche Vertreter des protopathischen Systems noch so primitiv organisiert, daß sie zum Teil ohne auffälligen inneren Umbau Fasern regenerieren können. Sicher ist eine solche Fähigkeit in den wesentlich höher spezialisierten Perikarya vom Typ A, die vorwiegend der epikritischen Sensibilität zugeordnet werden müssen, nicht mehr vorhanden. Ihre Empfindlichkeit gegenüber einer Axonschädigung geht auch daraus hervor, daß von ihnen im Verlauf der retrograden Degeneration ein beträchtlicher Teil zugrunde geht. Das Fehlen der großen A-Perikarya nach beendeter Reparation (KLEIST 1904) beruht aber wohl nicht zuletzt auf einer Anpassung der Nervenzellkörper an die wesentlich kleineren Kaliber der regenerierten Neuriten.

Von dem Ziel, sichere funktionelle Aussagen auf Grund von Veränderungen submikroskopischer Strukturen machen zu können, sind wir heute noch recht weit entfernt. Hier besteht für kombinierte histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen noch ein weites Feld. Trotzdem dürfte es von Interesse sein, wieweit sich die in dieser Arbeit berichteten Befunde in die derzeitige Vorstellung über das Geschehen im Nervenzellkörper während der retrograden Degeneration einordnen lassen.

Das wechselnde Zustandsbild der „primären Reizung“ wird seit den Interpretationen von COX (1898), MARINESCO (1889), KLEIST (1903), VAN GEHUCHTEN (1906) und CAJAL (1928) als Ausdruck einer im Zuge der Regeneration notwendigen Stoffwechselaktivierung gesehen, bei der es zu einem Verbrauch an Nissl-Substanz und damit zur Einschmelzung der Tigroid-Schollen kommt. In der ersten Phase des chromatolytischen Prozesses soll der Bedarf an Nukleoproteiden so groß sein, daß die gleichzeitig stattfindende Synthese von Nissl-Substanz nicht ausreicht, den ständigen Verbrauch zu decken (KLEIST 1903, BODIAN und MELLORS 1945). Der Ort dieses besonders intensiven Stoffwechselgeschehens ist offensichtlich die Zellmitte, in der es in erster Linie zur Auflösung der Nissl-Schollen kommt. Hier erreicht auch die saure Phosphataseaktivität stark erhöhte Werte (BODIAN und MELLORS 1945). Für die Annahme einer Stoffwechselintensivierung im Perikaryazentrum spricht nun ganz besonders das von mir beobachtete Verhalten des Chondrioms. Seine Verlagerung in die Zellmitte sowie die verstärkte Polymorphie und Frakturierung der Einzelelemente dürfen als Zeichen einer Aktivierung der Zelltätigkeit gedeutet werden, ebenso die gute Ausbildung der Cristae mitochondriales (PALADE 1956). Man wird deshalb wohl nicht fehlgehen, wenn man im Zellzentrum der chromatolytischen Ganglienzelle die Produktionsstätte des neuzubildenden Axoplasmas sucht.

Weniger gut paßt allerdings zu dieser Interpretation die Verminderung der Zytochromoxydase (HOWE und MELLORS 1945) und der Succinodehydrogenase (HOWE und FLEXNER 1946) in chromatolytischen Nervenzellen. Aber vielleicht führt hier, ähnlich wie bei dem Nucleoproteid-Stoffwechsel der höhere Bedarf, selbst bei einer gesteigerten Neusynthese, zu einer Verarmung der Enzymreserven in den Mitochondrien. Diese Enzymverarmung könnte dann die Ursache dafür sein, daß die färberische Darstellung der Mitochondrien in tigrolytischen Perikarya weniger gut (MARINESCO und TUPA 1922) und bei fortgeschrittener retrograder Degeneration gar nicht mehr gelingt (LUNA 1913). Nur so ist es auch zu verstehen, daß das außerordentlich auffällige Verhalten des Chondrioms, wie es aus meinen Untersuchungen an chromatolytischen Ganglienzellen hervorgeht, bisher noch nicht beobachtet worden ist.

Im Zusammenhang mit der Verarmung der Mitochondrien an Zytochromoxydase und an Succinodehydrogenase dürfte auch die Lipoidanreicherung im Zentrum chromatolytischer Nervenzellen stehen (ORTMANN 1952), die sich in meinen Präparaten in einer Vermehrung der Lipofuscin-Granula dokumentiert. Die Pigmentkörnchen entstehen, wie Übergangsformen deutlich zeigen, durch Mitochondrientransformation. Auf die Wahrscheinlichkeit einer solchen Umwandlung wies bereits COWDRY (1914) hin, doch konnte hierfür bisher noch kein sicherer Beweis erbracht werden.

Eine gewisse Diskrepanz zwischen den bisherigen lichtmikroskopischen und meinen elektronenmikroskopischen Befunden besteht auch in der Darstellung der Nissl-Substanz. Während mit lichtmikroskopischen Methoden nicht selten auf das Vorkommen totaler Tigrolysen (KLEIST 1903) hingewiesen wird, verhält sich nach meinen Beobachtungen der Randschollenkranz auch im Verlauf der schweren chromatolytischen Reaktion ausgesprochen refraktär. Die widersprechenden Ergebnisse lassen sich wie bei der Darstellung des Chondrioms wohl hinreichend mit einer Änderung des Zellechemismus erklären, nach der ein

färberischer Nachweis der Rest-Schollen nur noch schwach oder gar nicht mehr gelingt.

Sicher ist der Randschollenkranz in irgendeiner Weise von der retrograden Degeneration stoffwechselmäßig betroffen. Dies geht aus dem deutlichen Wandel seiner Ultrastruktur hervor, der vor allem in einer Disorganisation des ergastoplasmatischen Retikulums und in einer Rarefizierung und Agglutination seiner Ribosomen-Komponente beruht. Im Gegensatz zur Strukturänderung der randständigen Nissl-Substanz zeigt die der Kernkappe während der schweren Chromatolyse meistens die typische parallelisierte Anordnung der Ergastoplasmaspalten. Die topographische Situation der Kernkappe zwischen Kernmembran und Zellzentrum spricht nun dafür, daß ihre für normale Nissl-Schollen charakteristische Feinstruktur Spiegelbild eines intensiven Stoffwechsels ist. Danach wäre die weniger organisierte submikroskopische Struktur des Randschollenkranzes Ausdruck einer Aktivitätsminderung.

Gewisse Schwierigkeiten bereitet weiterhin die Interpretation der Kernverlagerung. Hier drängt sich der Verdacht auf, daß seine Verdrängung in die Zellperipherie mit einer Leistungsminderung verbunden ist. So wird dabei seine faltenreiche aktive Oberfläche auf den zur Zellmitte gerichteten Abschnitt reduziert. Die Vergrößerung des Kernkörperchens sowie das Fehlen der Protuberanzen an seiner Oberfläche könnte als Funktionseinschränkung und Speichervorgang gedeutet werden. Trotz dieser Überlegungen hat aber die Annahme, daß es im Verlauf der chromatolytischen Reaktion zu einer Tätigkeitssteigerung des Zellkernes kommt, eine mindestens ebenso große Berechtigung. Nach Untersuchungen von HYDÉN (1943, 1947) sind exzentrische Kernlage und Nukleolusvergrößerung Zeichen einer intensiven Synthese von Zytoplasmakleotiden.

Die Ursache des Zellumbaus während der „primären Reizung“ ist wahrscheinlich nicht nur eine Frage der Aktivitätsveränderung im Stoffwechsel sowie des Gleichgewichtszustandes zwischen Nucleoprotein-Verbrauch und -Synthese, sondern in erster Linie ein Anpassungsvorgang an die von dem Normalzustand abweichende regenerationsfähige Aufgabe, die nach VAN BIERVLIET (1900) mit einer Regression in eine Art Embryonalzustand verbunden ist. Der Untergang der Neurofilamente und wesentlicher Anteile des Golgi-Apparates kann aus dieser Sicht damit erklärt werden, daß in der Zeit der regenerativen Tätigkeit für die Erhaltung von „Berufsstrukturen“ die notwendigen Impulse fehlen.

Der Funktionswandel bedeutet für die Perikarya, insbesondere für den Typ A eine erhebliche Belastung, der eine größere Anzahl der Ganglienzellen nicht gewachsen ist. In ihnen kommt es dann früher oder später zu Fehlleistungen im Stoffwechselgeschehen und schließlich zu einem autotoxischen Zusammenbruch, der sich morphologisch durch eine vakuoläre Transformation des Chondrioms, Aufblähungen des ergastoplasmatischen Retikulums, lytischen Erscheinungen sowie durch eine blasige Auftreibung des Zellkernes äußert. Ob dieser Zustand, der von mir als „toxische Chromatolyse“ bezeichnet wurde, von vornherein ein irreversibler Prozeß ist, muß noch entschieden werden. In Zellen mit vakuolärer Mitochondrientransformation kann es nach Untersuchungen von ZOLLINGER (1948a) wieder zur Restitution kommen. Die im Ablauf der „toxischen Chromatolyse“ häufiger eintretende grobe Ausflockung des Kernchroma-

tins darf aber, wie aus einer anderen Arbeit von ZOLLINGER (1948b) hervorgeht, sicher als morphologisches Kriterium des Zelltodes gelten. Die relative Seltenheit solcher terminalen Erscheinungsbilder in retrograd veränderten Spinalganglien hängt vermutlich mit einem sehr schnellen Ablauf der Zytolyse und Resorption der Zellreste zusammen.

Die „toxische Chromatolyse“ verhält sich demnach funktionell und morphologisch grundsätzlich anders als die anderen Chromatolyse-Stadien. Schon KLEIST (1903) unterscheidet scharf zwischen regenerativen und tödlich degenerativen Vorgängen in tigrolytischen Perikarya. Die nekrobiotischen Formen werden von KLEIST nach ihrem äußeren Erscheinungsbild als „schrumpfende Degeneration“ (NISSL 1894) und als „vakuoläre Degeneration“ bezeichnet. Bei der letzteren unterscheidet der Autor noch grobvakuoläre und feinvakuoläre Formen. Von meinen eigenen Befunden dürfte nun die „toxische Chromatolyse“ sehr gut mit der feinvakuolären Form von KLEIST übereinstimmen, während es sich bei der grobvakuolären Form mit großer Wahrscheinlichkeit um gefensterete Perikarya handelt. Für „schrumpfende Degenerationen“ finden sich jedoch in meinem Material keine entsprechenden Bilder. Betrachtet man aber die von KLEIST für diesen Typ als Beispiel abgebildete Zelle, so drängt sich der Verdacht auf, daß es sich hier um jene artifizielle Veränderung handelt, die auch an Präparaten normaler Ganglien immer wieder als sog. „dunkle“ oder „dichte“ Zellen beschrieben werden, mit diesen aber sicher nichts zu tun haben (vgl. ANDRES 1961a).

Zusammenfassung

Die morphologischen Veränderungen in Spinalganglienzellen der Ratte während des Ablaufes der retrograden Degeneration wurden phasenkontrast- und elektronenmikroskopisch an Ultradünnschnitten mit folgenden Ergebnissen untersucht:

1. Die Beteiligung an der retrograden Degeneration ist nach kombinierter Neuro- und Rhizotomie von den Perikarya des Typus A wesentlich größer als von den Perikarya des Typus B. Es wird angenommen, daß die besondere Spezialisierung der A-Perikarya Ursache der höheren Empfindlichkeit gegenüber der Axonamputation ist.

2. Den phasenkontrastmikroskopisch feststellbaren Chromatolyse-Stadien entsprechen spezifische Veränderungen im Bereich der Ultrastruktur. Die Umwandlung der Feinstruktur betrifft in gleichem Maße die Satellitenhülle sowie die Schwannsche Scheide der Neuriten.

3. Die Anwendung der verfeinerten Methode führte zu mehreren Befunden, die sich in einem scheinbaren Gegensatz zu früheren lichtmikroskopischen Beobachtungen stehen. So kam es auch bei schweren Veränderungen nie zu einer Totaltigrolyse, sondern der 4–7 μ breite Randschollenkranz blieb immer erhalten. Das Chondriom zeigt hinsichtlich seiner Topographie in der Zelle als auch hinsichtlich der Gestalt seiner Einzelelemente besonders auffällige Veränderungen. Schließlich wurden Umwandlungen des Golgi-Apparates und der Neurofilamente erst in fortgeschrittenen Chromatolyse-Stadien evident.

4. Die in der Arbeit erhobenen submikroskopischen Befunde wurden zu den derzeitigen Vorstellungen über den chromatolytischen Prozeß in Beziehung

gesetzt und dabei versucht, den Strukturwandel als Ausdruck eines veränderten Zellstoffwechsels zu deuten.

Literatur

- ALTMANN, H. W.: Allgemeine morphologische Pathologie des Cytoplasmas. In: Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. 2/1. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- ANDERSON, E., and V. L. VAN BREEMEN: Electron microscopic observations on spinal ganglion cells of *Rana pipiens* after injection of Malononitrile. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 83 (1958).
- ANDRES, K. H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen patho- und nekrobiotischer Vorgänge in Spinalganglien. *Proc. Europ. Conf. Electron Micr. Delft* 1960.
- Untersuchungen über den Feinbau von Spinalganglien. *Z. Zellforsch.* **55**, 1—48 (1961).
- Elektronenmikroskopische Untersuchungen über präparatorisch bedingte und postmortale Strukturveränderungen in Spinalganglienzellen. *Beitr. path. anat.* (1961 b, im Druck).
- BIERVLIET, J. VAN: La substance chromophile pendant le cours du développement de la cellule nerveuse (chromolyse physiologique et chromolyse expérimentale). *Névraxe* **1**, 33—55 (1900).
- BODIAN, D.: Nucleic acid in nerve cell regeneration. In *Symp. Sec. Exp. Biol.*, No 1, Nucleic Acid. Cambridge: Cambridge University Press 1947.
- , and R. C. MELLORS: The regenerative cycle of motorneurons, with special reference to phosphatase activity. *J. exp. Med.* **81**, 469—488 (1945).
- BUNGE, R. P., M. B. BUNGE and H. RIS: Electron microscopic study of demyelination in an experimentally induced lesion in adult cat spinal cord. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 685—696 (1960).
- CAJAL, S. RAMON Y: Algunas variaciones fisiológicas y patológicas del aparato reticular de GOLGI. *Trab. Lab. Invest. biol. Univ. Madr.* **12**, 127—227 (1914).
- Degeneration and regeneration in the nervous system, vol. 2. Oxford: University Press 1928.
- CLARK, N. H.: Electron microscope studies of nuclear extrusions in pancreatic acinar cells of the rat. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 345—351 (1959).
- COWDRY, E. V.: The development of the cytoplasmic constituents of the nerve cells of the chick. I. Mitochondria and neurofibrils. *Amer. J. Anat.* **15**, 389—429 (1914).
- The comparative distribution of mitochondria in spinal ganglion cells of vertebrates. *Amer. J. Anat.* **17**, 1—29 (1914).
- COX, W. H.: Beiträge zur pathologischen Histologie und Physiologie der Ganglienzellen. *Int. Mschr. Anat. Physiol.* **15**, 241—258 (1898).
- DÖRING, G.: Pathologische Anatomie der Spinal- und Hirnnervenganglien einschließlich der Wurzelnerven. In: LUBARSCH-HENKE-RÖSSLES „Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie“, Bd. 13/V, S. 249—356. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- GEHUCHTEN, A. VAN: Anatomie du système nerveux de l'homme, 4. Aufl. Louvain 1906.
- GERSH, J., and D. BODIAN: Some chemical mechanism in chromatolysis. *J. cell. comp. Physiol.* **21**, 253—279 (1943).
- HARTMANN, J. F.: Mitochondria in cell bodies following section of axones. *Anat. Rec.* **100**, 49—59 (1948).
- Mitochondria in cell bodies of the hypoglossal nucleus and of spinal ganglia following section of nerves. *Anat. Rec.* **103**, Suppl., 541—542 (1949).
- Electron microscopy of motor nerve cells following section of axones. *Anat. Rec.* **118**, 19—33 (1954).
- HILD, W.: Das Neuron. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. IV/4. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.
- HOWE, H. A., and I. FLEXNER: Succinic dehydrogenase activity in normal and regenerating neurons. *Zit. von BODIAN* 1947.
- , and R. C. MELLORS: Cytochrome oxidase in normal and regenerating neurons. *J. exp. Med.* **81**, 489—500 (1945).

- HYDÉN, H.: Protein metabolism in the nerve cell during growth and function. *Acta physiol. scand.* **6**, Suppl. 17, 1—136 (1943).
- Die Funktion des Kernkörperchens bei der Eiweißbildung in Nervenzellen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **54**, 96—130 (1944).
- Protein and nucleotide metabolism in the nerve cell under different functional conditions. *Symp. Soc. exp. Biol.* **1**, 152—162 (1947).
- Spectroscopic studies on nerve cells in development, growth and function. In: *Genetic Neurology*, edit. by P. WEISS, p. 194—198. Chicago: University Press 1950.
- and H. HARTELIUS: Stimulation of the nucleoprotein-production in the nerve cells by malononitrile and its effects on psychic functions in mental disorders. *Acta psychiat. (Kbh.) Suppl.* **48**, 1—117 (1948).
- u. B. REXED: Der Wachstumsmechanismus in den Schwannschen Zellen während der Nervenregeneration. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **54**, 352—357 (1944).
- KLEIST, K.: Die Veränderungen der Spinalganglienzellen nach Durchschneidung des peripherischen Nerven und der hinteren Wurzel. *Virchows Arch. path. Anat.* **173**, 466—485 (1903).
- Experimentell anatomische Untersuchungen über die Beziehung der hinteren Rückenmarkswurzeln zu den Spinalganglien. *Virchows Arch. path. Anat.* **175**, 381—407 (1904).
- KÖRNER, F.: Beobachtungen über den Austritt geformter Substanzen aus dem Kernkörperchen bei menschlichen Nervenzellen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **42**, 362—378 (1937).
- LUGARO, E.: On the pathology of the cells of the sensory ganglia. (Sammelreferat.) *Rev. Neurol. Psychiat.* **2**, 228—232 (1904).
- LUNA, E.: Sulle modificazioni dei plastosomi delle cellule nervose nel trapianto ed in segnitto al taglio dei nervi. *Anat. Anz.* **44**, 413—415 (1913).
- MARCORA, F.: Di una fina alterazione delle cellule nervose del nucleo d'origine del grande ipoglosse consecutiva allo strappamento ed al taglio del nervo. *Boll. Soc. med.-chir. Pavia* **22**, 134—137 (1908).
- Sulle alterazioni dell'apparato reticolare interno delle cellule nervose motorici consecutive a lesioni dei nervi. *Riv. Pat. nerv. ment.* **15**, 393 (1910).
- MARINESCO, G.: Recherches sur l'histologie fine des cellules du système sympathique. *Rev. neurol.* **6**, 230—235 (1898).
- Sur la réparation des neuro-fibrilles après les sections nerveuses. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **2**, 407—409 (1904).
- , et A. TUPA: Recherches histo-pathologiques sur les mitochondries. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **87**, 292—296 (1922).
- MCCANN, G. F.: A study of mitochondria in experimental poliomyelitis. *J. exp. Med.* **27**, 31—36 (1918).
- NISSL, F.: Über die sogenannten Granula der Nervenzellen. *Neurol. Z.* **13**, 676, 781, 810 (1894).
- ORTMANN, R.: Über die Einförmigkeit morphologischer Reaktionen der Ganglienzellen nach experimentellen Eingriffen. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **167**, 431—441 (1952).
- PALADE, G. E.: In *Enzymes*, p. 185, edit. by O. H. GABLER. New York 1956.
- PALAY, S. L., and G. E. PALADE: The fine structure of neurons. *J. biophys. biochem. Cytol.* **1**, 69—88 (1955).
- PENFIELD, W. G.: Alterations of the Golgi apparatus in nerve cells Retispersion. *Brain* **43**, 290—305 (1920).
- PICARD, D., et A. STAHL: Signification fondamentale de certaines activités élaboratrices des cellules nerveuses. Étude critique de la notion actuelle de neurosécrétion. *J. Physiol. (Paris)* **48**, 73—95 (1956).
- ROULLIER, C., and W. BERNHARD: „Microbodies“ and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl., 355—360 (1956).
- SCHARF, J. H.: Sensible Ganglien. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. IV/3. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.
- SJÖSTRAND, F. S.: The ultrastructure of the outer segments of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscope. *J. cell. comp. Physiol.* **42**, 15 (1953).

- STRONGMAN, B. T.: A preliminary experimental study on the relation between mitochondria and discharge of nervous activity. *Anat. Rec.* **12**, 167—171 (1917).
- WARRINGTON, W. B., and F. GRIFFITH: On the cells of the spinal ganglia and on the relationship of their histological structure to the axonal distribution. *Brain* **27**, 297—326 (1904).
- WATSON, M. L.: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 147—156 (1959).
- ZOLLINGER, H. U.: Phasenkontrastmikroskopische Beobachtungen über Zelltod. *Schweiz. Z. Path.* **11**, 276—282 (1948).
- Trübe Schwellung und Mitochondrien. *Schweiz. Z. Path.* **11**, 617—634 (1948).

Dr. med. KARL HERMANN ANDRES,
Histologisches Institut der Universität des Saarlandes
Homburg (Saar), Univ.-Krankenhaus

From the Department of Anatomy, Kyoto Prefectural Medical College, Kawaramachi,
Kyoto (Japan) (Director: Prof. H. YAMADA, M. D.)

AN ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF THE ADRENAL CORTICAL TISSUE OF THE DOMESTIC FOWL

By

HISAO FUJITA

With 5 Figures in the Text

(Received February 9th, 1961)

Although many workers have studied the origin of secretory granules in various glands, fundamental questions still remain to be answered by cytological observations. The adrenal cortex has been examined with the electron microscope by LEVER (1955, 1956a, 1956b), BELT and PEASE (1956), ZELANDER (1957), LUFT and HECHTER (1957), HONJIN, IZUMI and NAKAMURA (1957), BELT (1958), DE ROBERTIS and SABATINI (1958), ASHWORTH, RACE and MOLLENHAUER (1958), BELT (1960) and others. LEVER (1955) concluded that in mammals, lipid droplets of the adrenal cortex are elaborated by mitochondria, and BELT (1958) suggested that, in the rat, liposomes may arise from a microbody, while ASHWORTH, RACE and MOLLENHAUER (1958) reported that in the rat the cytoplasmic reticulum and mitochondria are thought to be related to synthesis of adrenal cortical hormone. The fine structure of the *avian adrenal cortical tissue*, however, has not been described.

With the electron microscope, we obtained new findings concerning the cortical lipid formation in the domestic fowl. This process differs in certain respects from that in mammals as reported by several authors.

Materials and Methods

Thirty domestic White Leghorn hens, ranging in age from 14 days of incubation to 980 days after hatching, were used. After decapitation of the animals, small pieces of the adrenal glands were immediately removed, fixed for one hour in Palade's buffered osmium solution, dehydrated through increasing concentrations of alcohol, and embedded in a mixture of one part methyl and four parts butyl methacrylate. Sections, cut with the J.U.M. 4 ultramicrotome, were examined with a J.E.M. 4A type electron microscope. Furthermore the Sudan III, Sudan black B, and Nile blue methods were performed in frozen sections of the adrenals fixed in 10 per cent neutral formalin.

Observations

General structure. In the domestic fowl, it is impossible to differentiate three zones in the adrenal cortex, because the cortical tissue is distributed in the form of irregularly arranged columns throughout the gland. All cortical tissues begin to be positive with Sudan III, Sudan black B, and Nile blue in the 10 or 11 day chick embryo. In the 15 day chick embryo, the cytoplasm of the cells is always strongly positive and contains a number of small and large sudanophilic granules. These reactions become stronger day by day until about 30 days after hatching. The sudanophilic substance is uniformly distributed throughout the cortical areas. No difference was found with these methods between the peripheral and

the central part of the organ, though KAR (1947) reported, using the light microscope, that in the hen the cortical cells are somewhat larger in the peripheral region than in the central one of the gland. By electron microscopy, however, no differences were observed in the domestic fowl between the cortical cells of the peripheral part of the gland and those of the central part. Here we report on the fine structure of the central part of the gland.

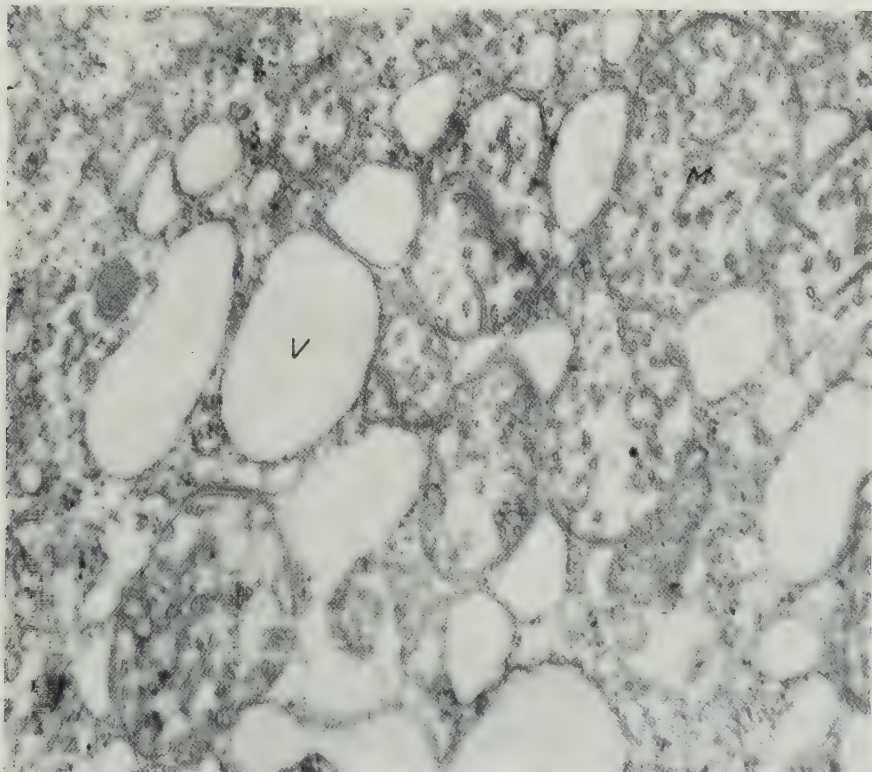


Fig. 1. Part of an adrenal cortical cell from a 20 day old chick. Many mitochondria (*M*) with villous crests and many vacuoles (*V*) are seen. $\times 40,000$

Mitochondria. In all cortical cells, a larger proportion of the cytoplasm is made up by many mitochondria and vacuoles (Figs. 1—5). Most mitochondria are not club-shaped, but round or oval and less than 1.5μ in diameter irrespective of the age of the animal (Figs. 1—5). The membrane appears as a bilaminar structure, while the cristae, as a rule, are not laminar but villous as reported by LEVER (1955) and BELT and PEASE (1956) (Figs. 1—5). In the embryo, however, the cristae are not as well developed as later on in the chick and the hen (Fig. 2). Accordingly, in the embryo, the interior of the mitochondria is for the most part homogeneous and of a low electron density (Figs. 2, 3).

Vacuoles. All cortical cells show vacuoles in their cytoplasm (Figs. 1—5). Mostly they are round or oval and are less than 1.5μ in diameter. The limiting membranes are all similar in appearance, measuring $30\text{--}50\text{ \AA}$ in thickness. Small particles, $100\text{--}200\text{ \AA}$ in diameter, can be seen on the outer surfaces of

some vacuoles (Figs. 1, 2, 3). The interior of such vacuoles is homogeneous and of a low electron density. In the chick, some vacuoles are formed by the outer

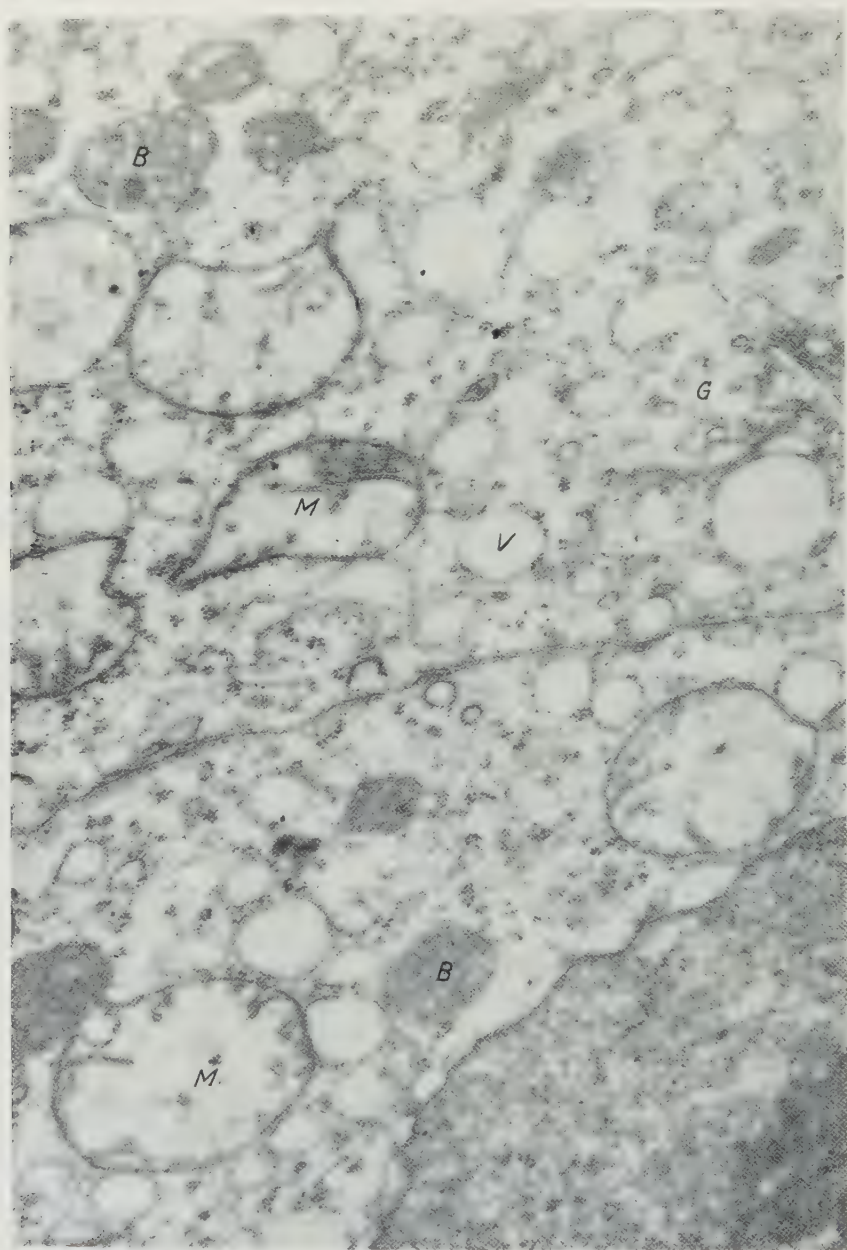


Fig. 2. Part of cortical cell from a 14 day old chick embryo. Microbody (*B*), Golgi apparatus (*G*), vacuoles (*V*) and mitochondria (*M*) are seen. $\times 40,000$

nuclear membrane of the cell (Fig. 3). For these reasons, the vacuoles are considered as endoplasmic reticulum. The vacuoles are in contact with each other

or with mitochondria. In the former case, the area of contact is represented by a double membrane, while in the latter case a triple membrane is seen (Figs. 1, 3). The vacuoles found in the domestic fowl correspond to the intra-

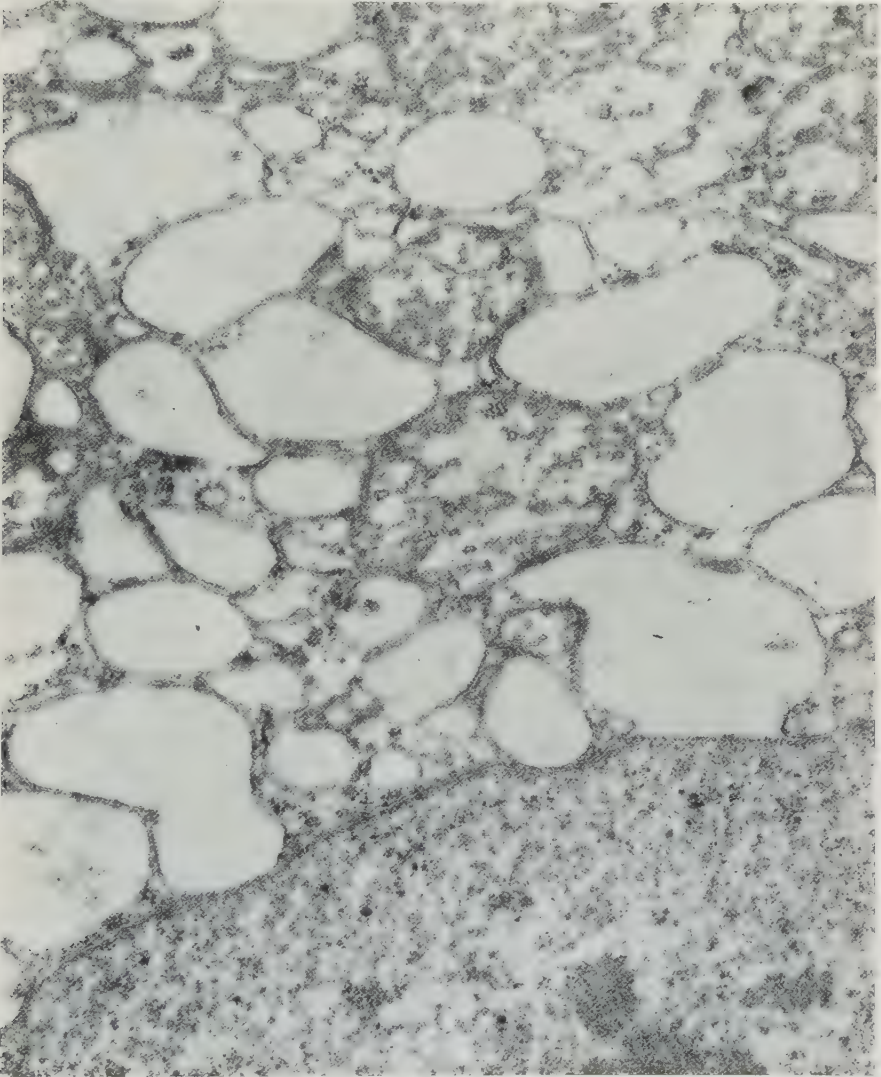


Fig. 3. Part of an adrenal cell from a 20 day old chick. Note that vacuoles arise from the outer nuclear membrane. $\times 42,000$

cellular sacs described by LEVER (1955). The cytoplasmic vacuoles become larger as the animal grows older. The vacuoles in the 14—15 day old chick embryo are somewhat smaller than the mitochondria, but in the 20—30 day old chick, they are as large as the mitochondria. LEVER (1955) states that the large sacs closely resemble Golgi vacuoles while the small sacs are parts of the endoplasmic reticulum. However, in the fowl, we could not separate the vacuoles

into large and small types. Both rough and smooth surfaced vacuoles are here considered to be endoplasmic reticulum.

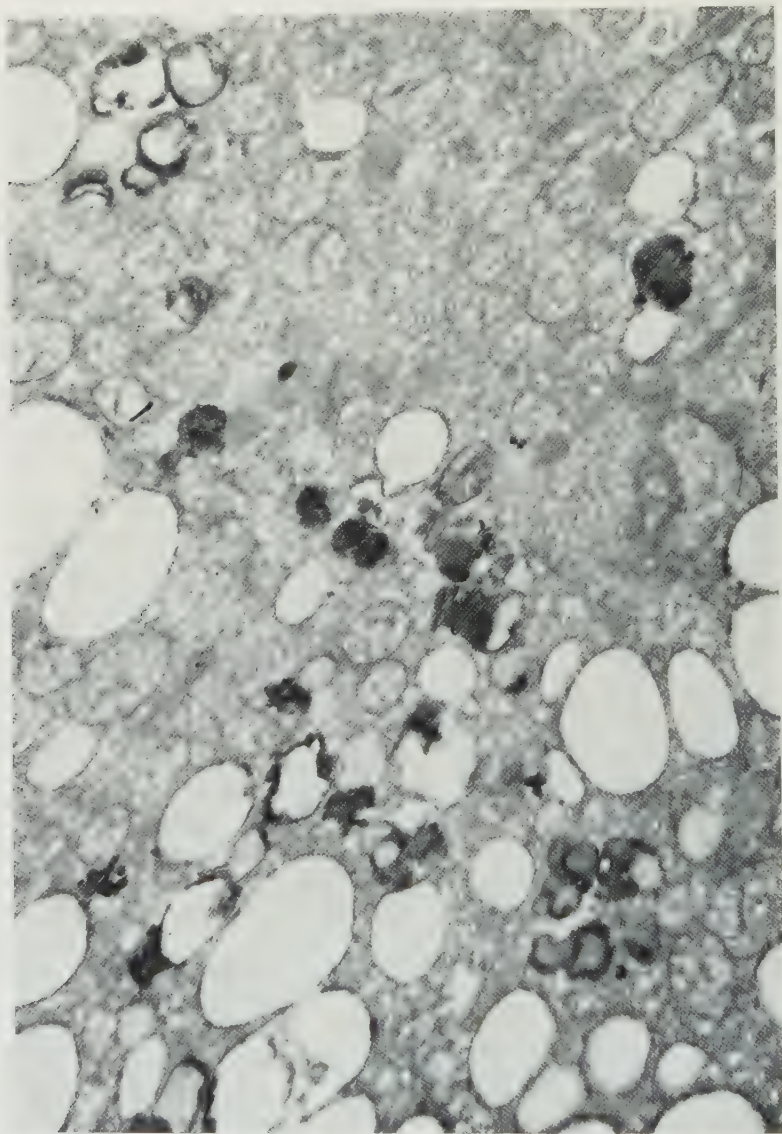


Fig. 4. Part of an adrenal cortical cell from a 980 day old hen. Many osmiophilic droplets of irregular shape are seen in the mitochondria and around or within the cytoplasmic vacuoles. $\times 15,000$

Microbodies. Round or oval osmiophilic bodies, smaller than mitochondria, and enclosed by a single membrane, are sometimes seen in the cortical cytoplasm of the young chick and of the embryo (Fig. 2). Their structure is not homogeneous but granular, and they are less dense than the osmiophilic droplets described in the following section. These bodies are considered to be identical with the microbodies reported by ROUILLIER and BERNHARD (1956) in the rat

liver. Although so far there is no satisfactory evidence for defining the micro-body as both a mitochondrial and a liposomal precursor, it is nevertheless interesting to note that these structures are more frequently seen in cortical cells of the embryo than in those of the chick and hen.

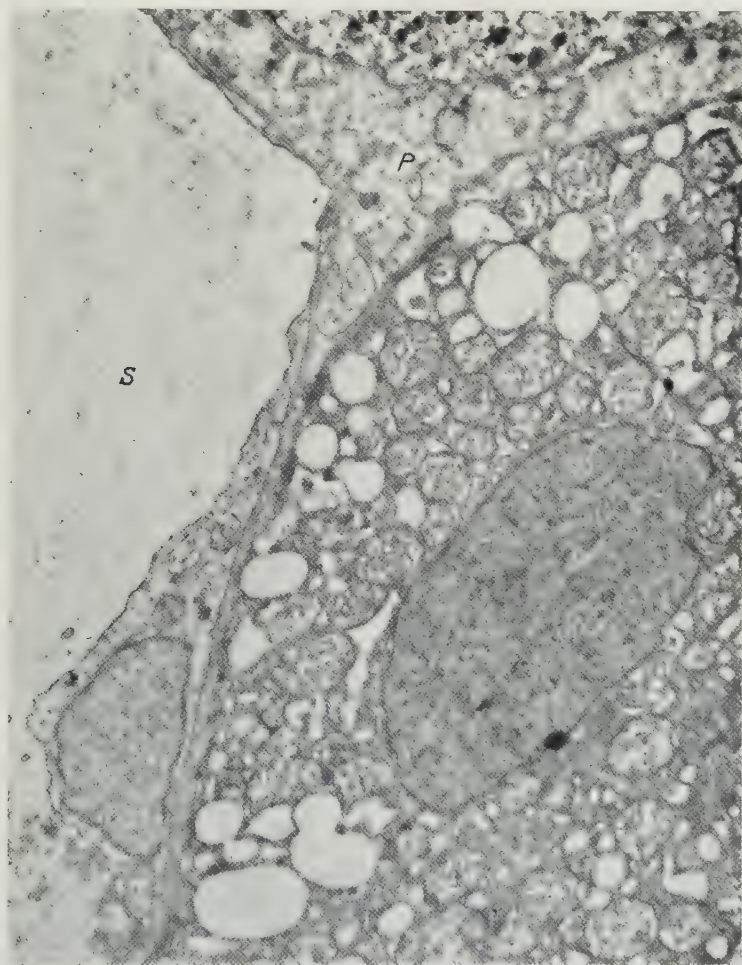


Fig. 5. Sinusoid capillary (S) and perisinusoidal space (P) of the adrenal gland of a chick. $\times 13,000$

Osmiophilic droplets. In the 980 day old hen, many round, oval or irregular osmiophilic droplets are seen in the cytoplasm (Fig. 4). Some of the oval bodies closely resemble mitochondria with a characteristic internal structure, but the droplets of irregular shape are always seen around or within the cytoplasmic vacuoles described above. The droplets are usually homogeneous and black, but the central regions of some round or oval bodies are relatively low in electron density. LEVER (1955) reported that in mammals the osmiophilic droplets are elaborated by or accumulated within the mitochondria. It is considered that,

in the fowl, the droplets accumulate not only within mitochondria but also within or around cytoplasmic vacuoles (Fig. 4). It is also interesting that the droplets are only observed in the hen and are not present in the embryo or young chick.

Golgi apparatus. In the adrenal cortex of the chick and hen, a typical Golgi apparatus, as described by DALTON and FELIX (1954), is not found, but the above-mentioned smooth-surfaced large round vacuoles are frequently seen in these stages. Typical Golgi fields consisting of Golgi vacuoles, Golgi membranes and Golgi vesicles, however, are to be found in the embryonic cortical cell (Fig. 2).

Vascular relationship. LEVER (1955, 1956b) and WETZSTEIN (1957) have already published reports dealing with this topic. In the domestic fowl, a perisinusoidal space is present between the basement membrane of the endothelial cell and the parenchymal cell. An interparenchymal cell space is also present between parenchymal cells, especially between cortical and medullary elements. These spaces communicate with each other (Fig. 5). In the present study, the adrenal cortical tissue was found to be distributed throughout the gland in the form of irregularly arranged columns, so that one could easily observe the relationship between the cortical and the medullary columns. Most of these parts are separated by the interparenchymatous cell space. The vacuoles of the cortical cells expand here and there from the cell surface into these spaces, but within the spaces vacuoles or detached cortical cytoplasmic fragments are not seen (Fig. 5). It may be that all cortical and medullary cells are exposed to these spaces at some points on the cell membranes. Secretory substances may be first secreted into these spaces from the cell, and then infiltrate into the capillary lumen.

Discussion

LEVER (1955) found many osmiophilic substances in mammalian adrenal cells and called them lipid droplets. But in the domestic fowl, these droplets are not found at all in the adrenal cortex of the chick and embryo, but are seen in that of the hen only. On the other hand, these cells have already acquired sudanophilia in the embryo. The Sudan black B, Sudan III, and Nile blue reactions of the cortical cells become positive in the 10 or 11 day old embryos, and in the 15 day old embryo, the cytoplasm is always strongly positive and contains a number of small and large sudanophilic granules. Schultz and Smith-Dietrich reactions are also strongly positive in the embryo. From these facts it appears that lipid must be present even in the cortical cells of the young chick and the embryo. The cortical cell of the chick and the embryo, however, lacks the osmiophilic droplets described above but contains many mitochondria, vacuoles and some microbodies. Though BELT (1958) concluded that liposomes may arise from the microbodies in the rat adrenal, no osmiophilic droplets are found in the cortical cell of the chick and the embryo. It is suggested, therefore, that in the domestic fowl, the osmiophilic droplets found in the 980 day old hen do not always represent the lipid involved in the cortical hormone. Moreover, it has been reported by many histochemists that lipids are not always stained black by osmic acid. It is also clear that osmiophilic droplets visible with the light microscope will not always appear uniformly dense in ultrathin sections. Hence we believe that the cortical lipid is related to the homogeneous substance in the

cytoplasmic vacuoles. In the fowl, the cortical lipid implicated in the cortical hormone is surely produced within the cytoplasmic vacuoles considered as endoplasmic reticulum; presumably this takes place with the aid of mitochondria which are usually near them. KAR (1947) reported that many vacuoles found with the light microscope coincide with lipid droplets in the cortical cell of the domestic fowl. Osmiophilic droplets, elaborated from mitochondria, accumulated within or around the cytoplasmic vacuoles and seen in the hen but not in the chick and the embryo, are considered to be a substance related to aging.

Summary

The fine structure of the adrenal cortex of the domestic fowl has been studied from the 14th day of embryonic life to 980 days after hatching, using the electron microscope.

Many mitochondria and vacuoles, round or oval, are observed in all cortical cells. The cristae mitochondriales are not laminar but villous. In the embryo, the mitochondria, whose cristae are not as well developed as those in chick and hen, are very low in electron density. Cytoplasmic vacuoles, either rough or smooth-surfaced, and with a homogeneous content of low electron density, are enclosed by a similar limiting membrane. Some of them are formed by the outer nuclear membrane and are characterized by many small particles on their outer surfaces. These vacuolated structures are perhaps parts of the endoplasmic reticulum. In the 980 day old hen, a number of osmiophilic droplets, round or irregularly shaped, are seen. Some of these are formed by mitochondria, while others accumulate within or around cytoplasmic vacuoles. In the embryo and in the chick, such droplets are never seen. It is assumed that the droplets are substances related to ageing, and that the lipid implicated in cortical hormone is not osmiophilic in the young chick and the embryo. It is perhaps produced in the cytoplasmic vacuoles with the aid of mitochondria. A perisinusoidal space and interparenchymatous cell spaces similar to those described for mammals by other workers, are observed in the adrenal gland of the domestic fowl. I assume that the secretory substance of the cortical and the medullary cell is first secreted into these spaces and then infiltrates into the capillary lumen.

References

- ASHWORTH, C. T., G. J. RACE and H. H. MOLLENHAUER: Study of functional activity of adrenocortical cells with electron microscopy. *Amer. J. Path.* **35**, 424—436 (1958).
- BACHMANN, R.: Die Nebenniere. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, herausgeg. von W. BARGMANN, Bd. 6, Teil 5. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954.
- BELT, W. D.: The origin of adrenal cortical mitochondria and liposomes. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 337—340 (1958).
- Fine structural changes in the adrenal cortex of the hamster during starvation. *Anat. Rec.* **136**, 162—163 (1960).
- , and D. C. PEASE: Mitochondrial structure in sites of steroid secretion. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2** Suppl., 369—374 (1956).
- DALTON, A. J., and M. D. FELIX: Cytologic and cytochemical characteristics of the Golgi substance of epithelial cells of the epididymis. *Amer. J. Anat.* **94**, 171—207 (1954).
- HONJIN, R., S. IZUMI and T. NAKAMURA: Electron microscopic studies on the adrenal cortex. *Acta anat. nippon.* **32** Suppl., 1 (1957).

- KAR, A. B.: The action of male and female sex hormones on the adrenals in the fowl. *Anat. Rec.* **97**, 551—561 (1947a).
- The adrenal cortex testicular relations in the fowl. The effect of castration and replacement therapy on the adrenal cortex. *Anat. Rec.* **99**, 177—197 (1947b).
- LEVER, J. D.: Electron microscopic observations on the adrenal cortex. *Amer. J. Anat.* **97**, 409—430 (1955).
- Remarks on the electron microscopy of the rat luteum and comparison with earlier observations of the adrenal cortex. *Anat. Rec.* **124**, 111—125 (1956a).
- Subendothelial space in certain endocrine tissues. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2** Suppl., 293—297 (1956b).
- LUFT, J., and O. HECHTER: An electron microscopic correlation of structure with function in the isolated perfused cow adrenal, preliminary observations. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 615—625 (1957).
- MILLER, R. A., and O. RIDDLE: The cytology of the adrenal cortex of normal pigeons and in experimentally induced atrophy and hypertrophy. *Amer. J. Anat.* **71**, 311—335 (1942).
- ROBERTIS, E. DE, and D. SABATINI: Mitochondrial change in the adrenocortex of normal hamster. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 667—674 (1958).
- ROUILLIER, C., and W. BERNHARD: Microbodies and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2** Suppl., 355—360 (1956).
- WETZSTEIN, R.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Nebennierenmark von Maus, Meerschweinchen und Katze. *Z. Zellforsch.* **56**, 517—576 (1957).
- ZELANDER, T.: The ultrastructure of the adrenal cortex of the mouse. *Z. Zellforsch.* **46**, 710—716 (1957).

Assistant Professor HISAO FUJITA, M.D.,
Department of Anatomy, Kyoto Prefectural Medical College,
Kawaramachi, Kamikyoku, Kyoto (Japan)

Institut d'Histologie et Embryologie de la Faculté de Médecine de Lisbonne (Portugal)
(Dir.: Prof. Dr. M. J. XAVIER MORATO)

SUR LA STRUCTURE ET LE POUVOIR PHAGOCYTAIRE
DES PLAQUETTES SANGUINES*

Par

J. F. DAVID FERREIRA

Avec 8 Figures dans le Texte

(Manuscrit reçu le 16 Mars 1961)

Introduction

Au cours de ces dernières années l'emploi de la microscopie électronique a permis un notable progrès dans les études de la pinocytose et de la phagocytose. Les recherches au niveau ultrastructural ont apporté sur ces phénomènes une connaissance plus intime du mécanisme de la pénétration de substances étrangères dans la cellule et ont démontré que ces phénomènes cellulaires sont plus généraux qu'il ne l'était admis jusqu'à présent.

Au cours d'expériences dont le but était l'étude de la distribution et de l'action du dioxyde de thorium colloïdal (thorotrast) dans les organes du Lapin (HORTA et FERREIRA 1960) nous avons observé la présence de granules de cette substance à l'intérieur des plaquettes situées dans les capillaires pulmonaires (FERREIRA 1960).

Avant l'emploi de la technique des coupes BLOOM et coll. (1955) ont observé avec le microscope électronique, que les plaquettes humaines mises en contact «in vitro» avec des particules inframicroscopiques de quartz présentent une forte tendance à attirer ces particules. Ces observations méritaient en évidence la propriété de l'adhésivité. Après la mise au point de la technique des coupes fines, les plaquettes sanguines, dont la petite taille rendait difficile les études au microscope optique, ont été étudiées au microscope électronique d'une façon très détaillée. Les nombreux travaux déjà publiés (voir bibliographie in: MARCOVICI et GAUTHIER 1959) donnent des informations importantes non seulement sur leur morphologie mais aussi sur la signification physiologique de leurs constituants ultrastructuraux (voir bibliographie in: SCHULZ et HIEPLER 1959).

Dans ce travail nous rapportons les résultats de nos expériences réalisées «in vivo» et «in vitro» qui démontrent dans les plaquettes sanguines l'existence d'une propriété phagocytaire laquelle a été mise en évidence par l'emploi d'une substance étrangère.

Materiel et Méthodes

Les observations présentées dans ce travail ont été faites sur des coupes de tissu pulmonaire de lapins injectés par voie endoveineuse avec du dioxyde de thorium colloïdal et sur des coupes de plaquettes humaines isolées et mises en contact «in vitro» avec cette même substance.

Aux lapins utilisés nous avons administré, par voie endoveineuse, 1cm³ d'une solution de dioxyde de thorium colloïdal par kilogramme de poids; ils ont été sacrifiés à la fin de périodes variables, entre 3 minutes et 24 heures après l'injection. Les fragments du poumon ont été prélevés immédiatement après la mort et fixés en acide osmique à 1 % tamponné à pH 7,2. Après la fixation ces fragments ont été inclus au méthacrylate de butyle.

* Avec la collaboration technique de Mme. KARIN DAVID FERREIRA.

Pour les expériences «in vitro» les suspensions de plaquettes ont été préparées à partir de sang humain obtenu par ponction veineuse ; immédiatement après son prélèvement, le sang est centrifugé avec $\frac{1}{9}$ de son volume de citrate de sodium à 3,8 % pendant 20 minutes à 500 tours/minute. La couche de plasma surnageant décantée est centrifugée de nouveau pendant 15 minutes à 4000 tours/minute dans une centrifuge réfrigérée à -4°C . Le culot est alors suspendu dans du citrate de sodium à 3,8 % auquel on a ajouté 2 gouttes de dioxyde de thorium colloïdale. Cette suspension est mise dans une étuve à 37°C . La durée du contact entre les plaquettes et la substance étrangère a été de 15 minutes ou 1 heure. Ensuite la suspension est centrifugée de nouveau pendant 10 minutes à 4000 tours/minute. Le culot de plaquettes obtenu a été fixé à l'acide osmique à 1 % tamponné à pH 7,2 et coupé en petits morceaux.

Inclusion au méthacrylate de butyle selon la technique habituelle. Le matériel en verre utilisé dans ces expériences a été préalablement silicé. Les coupes faites au ultramicrotome de Porter-Blum ont été observées au microscope RCA EMU 3 à 100 KV¹. Une partie des coupes des expériences «in vitro» a été «colorée» avec de l'acetate d'uranyl selon la technique de Watson (1958).

Nous exprimons notre reconnaissance au Dr. PARREIRA qui a permis l'utilisation du matériel du Laboratoire d'Hématologie pour l'isolement des plaquettes.

Observations

La présence d'un grand nombre de plaquettes à l'intérieur des capillaires pulmonaires est très fréquente. Ce phénomène déjà signalé par plusieurs auteurs rend le poumon un excellent matériel pour l'étude des plaquettes du sang circulant. Avec le microscope électronique ce phénomène a été décrit par POLICARD et coll. (1959) chez le Rat et par SCHULZ (1957, 1959) dans les capillaires pulmonaires du *Myoxus glis* en hibernation.

Dans les capillaires du poumon du Lapin les plaquettes se trouvent isolées ou en petits groupements (Figs. 1 et 2), elles sont généralement allongées et ont environ 2 à 3μ de longueur et 0,5 à $1,4\mu$ de largeur. Quelquefois on remarque dans les groupements, des plaquettes géantes dont le diamètre est beaucoup plus grand (Fig. 1).

La surface de ces plaquettes, souvent en contact avec les cellules endothéliales des parois des capillaires, est irrégulière présentant des encoches et des pseudopodes. Dans la membrane qui les entoure, dont l'épaisseur est de 60 Å, on peut reconnaître dans les coupes favorables trois lamelles identiques à celles observées habituellement dans les membranes cellulaires. A l'intérieur, dans la substance fondamentale, le hyalomère, on observe de nombreuses formations corpusculaires dont l'ensemble s'appelle habituellement le granulomère.

Dans le granulomère des plaquettes du sang du Lapin on reconnaît trois des quatre types de granules décrits par SCHULZ, JÜRGENS et HIEPLER (1958) dans le granulomère des plaquettes du sang humain :

1^o — Granulomère α — constitué par des granules allongées, de 120—300 m μ de diamètre. Ce sont les granules les plus nombreux des plaquettes et ils ont été identifiés aux granules azurophiles observés au microscope optique (RINEHART 1955 ; SUEYASC et TAGESHIGE 1956 ; GOODMAN, REILLY et MOORE 1957). Dans quelques unes de nos photographies on peut reconnaître que ces granules sont limités par une membrane de 130 Å formée par deux lamelles denses de 40 Å

¹ Laboratório de Microscopia Electrónica Calouste Gulbenkian.

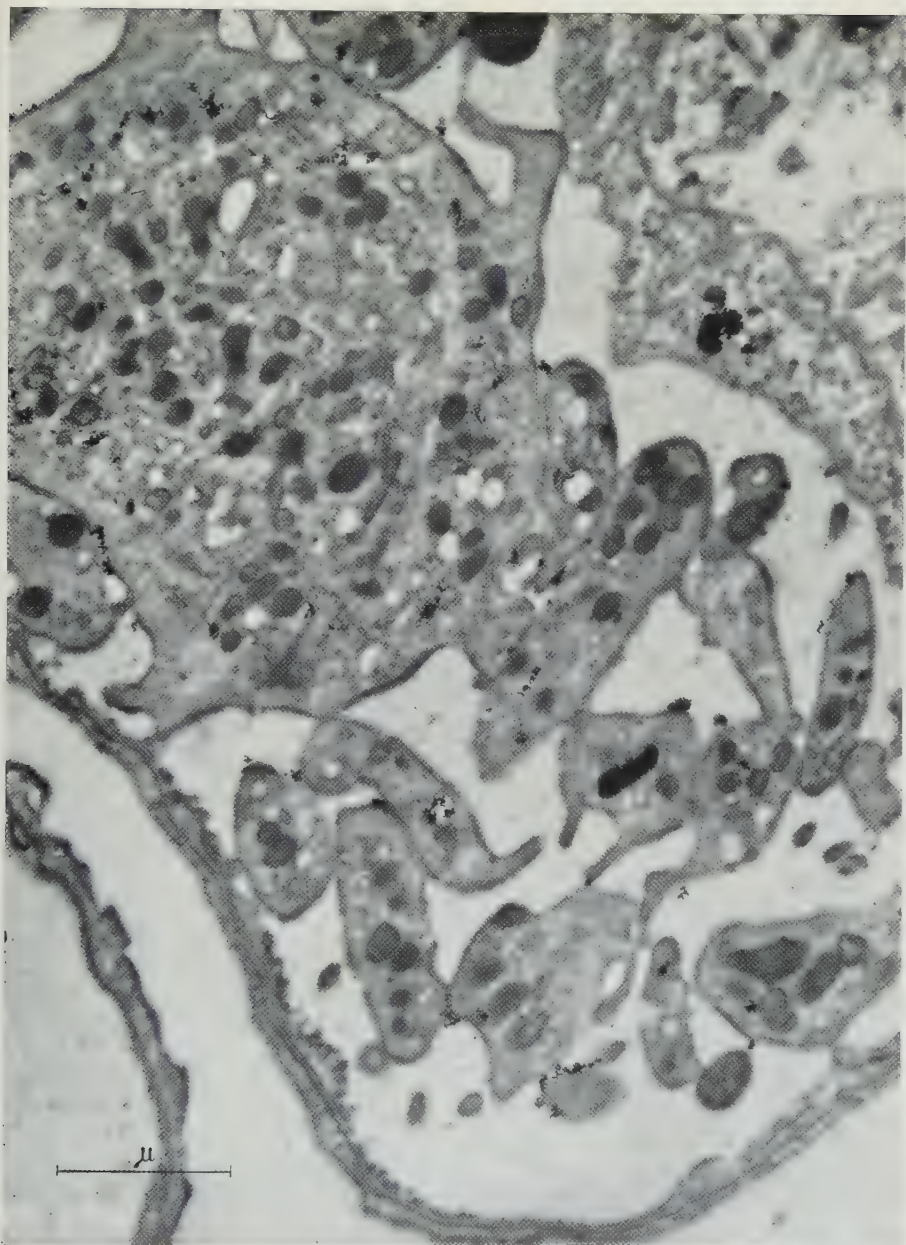


Fig. 1. Capillaire de poumon d'un lapin injecté avec du dioxyde de thorium colloïdal. Prélèvement 24 heures après l'injection. Groupement de plaquettes qui contiennent des granules de thorotrast. En haut et à gauche on voit une plaquette géante. Gross. 24.400 ×

séparées par un espace clair de 50 Å (Fig. 4). Leur contenu est granuleux et chez certains on peut reconnaître des régions plus denses généralement excentriques (Figs. 4 et 5). On observe parfois à la surface des granules α des petites lobulations (Fig. 4).

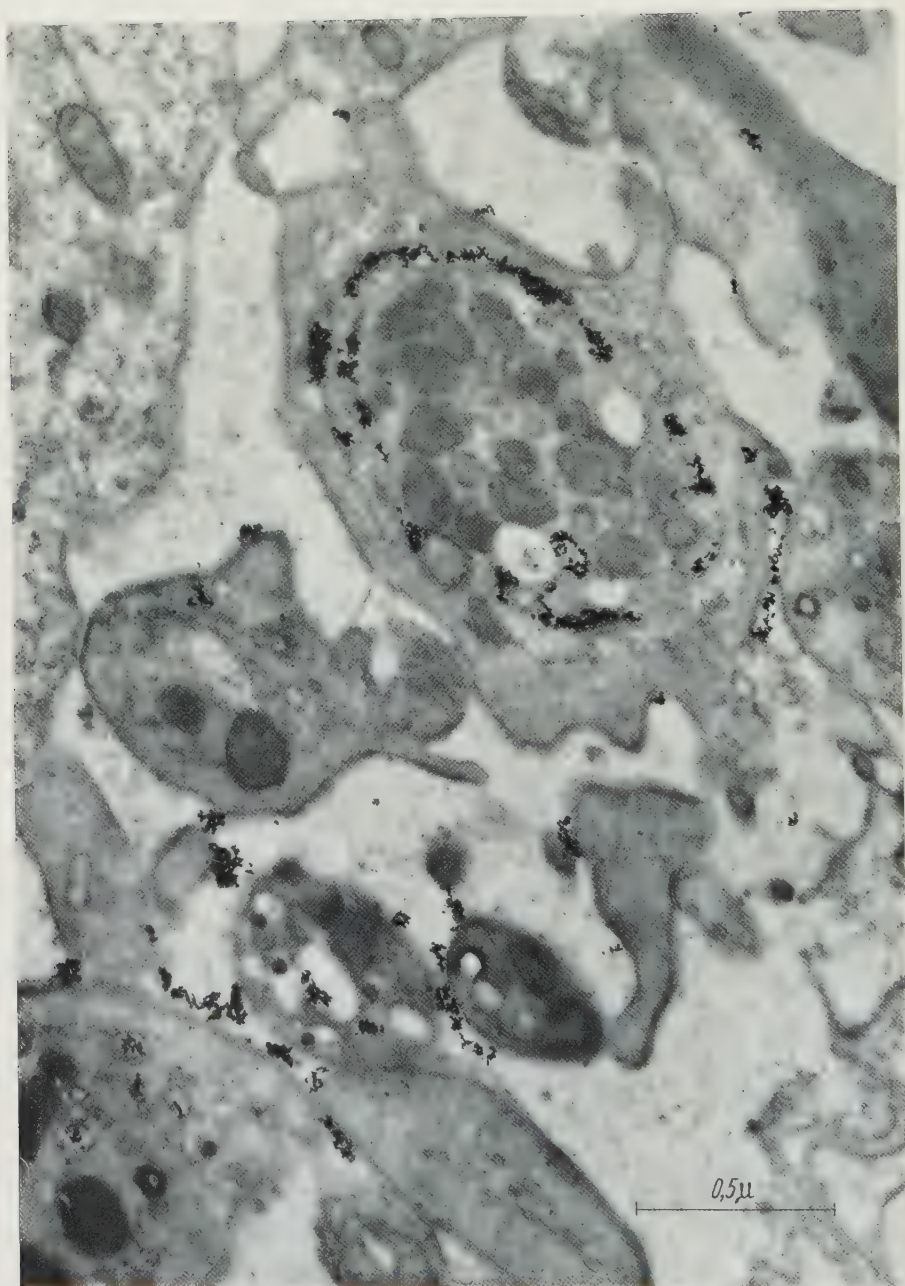


Fig. 2. Plaquettes sanguines à l'intérieur d'un capillaire pulmonaire d'un lapin injecté avec du dioxyde de thorium colloïdal. Prélèvement 24 heures après l'injection. On peut voir des nombreux granules de thorotrast à la surface et à l'intérieur des plaquettes. Gross. 53.100 ×

2^o — Granulomère β — constitué par l'ensemble des mitochondries. Elles sont peu nombreuses et possèdent un nombre très réduit de crêtes.

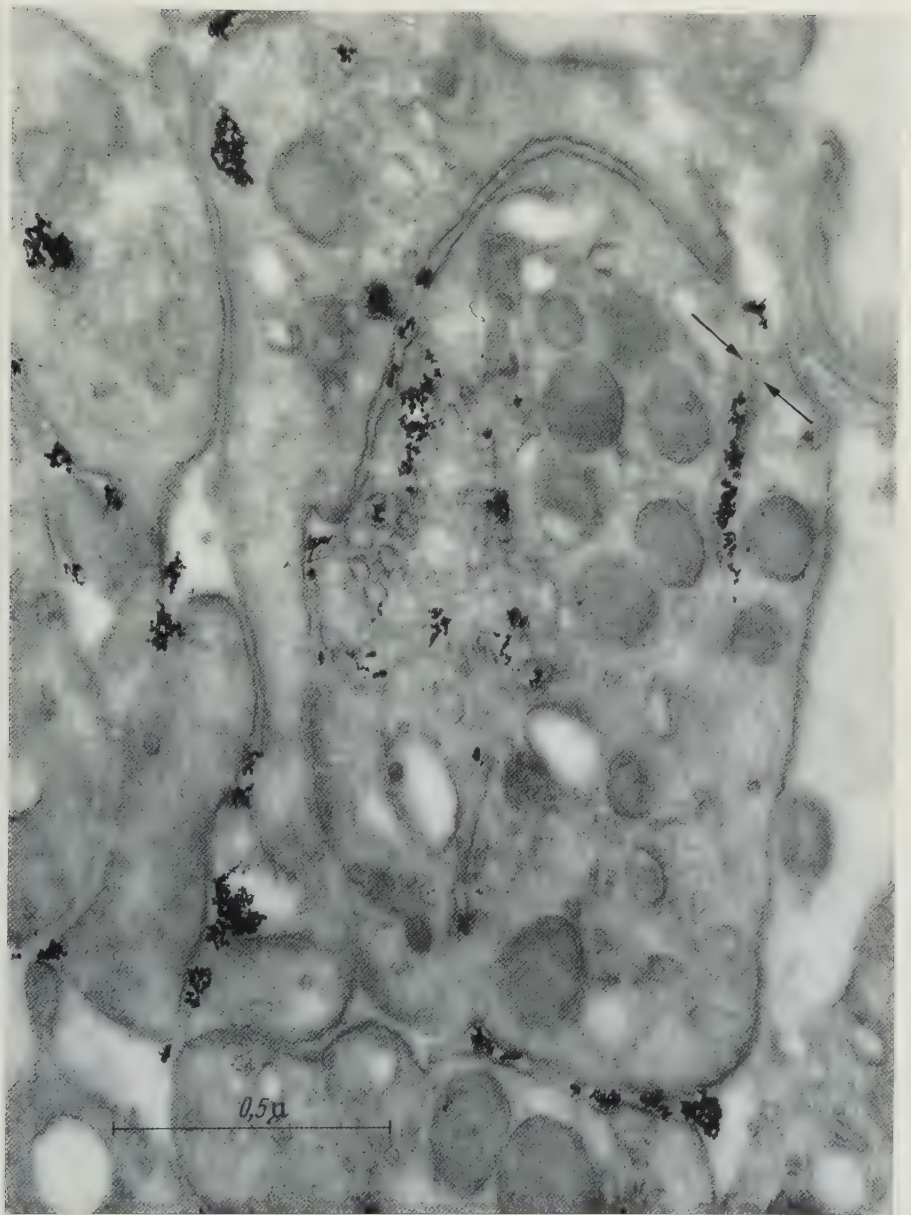


Fig. 3. Plaquette sanguine d'un lapin injecté avec du dioxyde de thorium colloïdal. Prélèvement 24 heures après l'injection. Parmi les éléments habituels des plaquettes on voit des canalicules dont l'intérieur est rempli de thorotrast. Signalée par des flèches (↑): formation d'un tubule.
Gross. 94.400 ×

3° — Granulomère γ — formé par l'ensemble des microvesicules, vacuoles et saccules, il correspond aux éléments clairs des plaquettes décrits par FEISLY, GAUTHIER et MARCOVICI (1958).

Dans les plaquettes du sang humain nous avons observé les éléments ultra-structuraux déjà signalés par plusieurs auteurs et qui sont identiques à ceux décrits à propos des plaquettes du sang du Lapin.

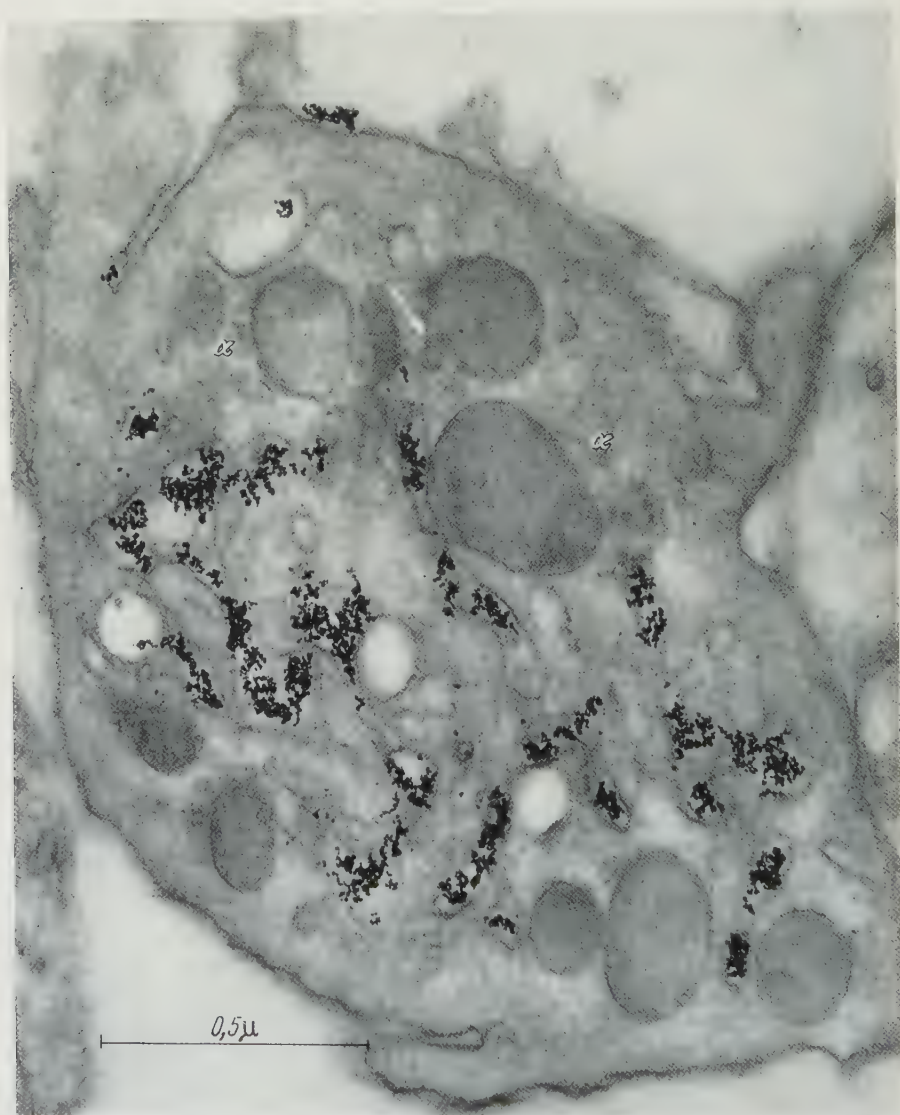


Fig. 4. Plaquette sanguine d'un lapin injecté avec du dioxyde de thorium colloïdal. Fixation 24 heures après l'injection. Parmi les composants habituels on observe de nombreux canalicules qui contiennent une grande quantité de thorotrast. (α) granules α limités par une double membrane et qui ont des régions excentriques plus denses. (\uparrow) Petite lobulation à la surface d'un granule α . Gross. 75.000 \times

Ni dans les plaquettes du sang du Lapin ni dans les plaquettes du sang humain nous n'avons eu l'occasion d'observer les éléments du granulomère δ défini par SCHULZ et coll. (1958) comme étant l'ensemble des cytosomes dont l'intérieur plus clair contient des nombreux granules de 55 Å très contrastés. Selon ces

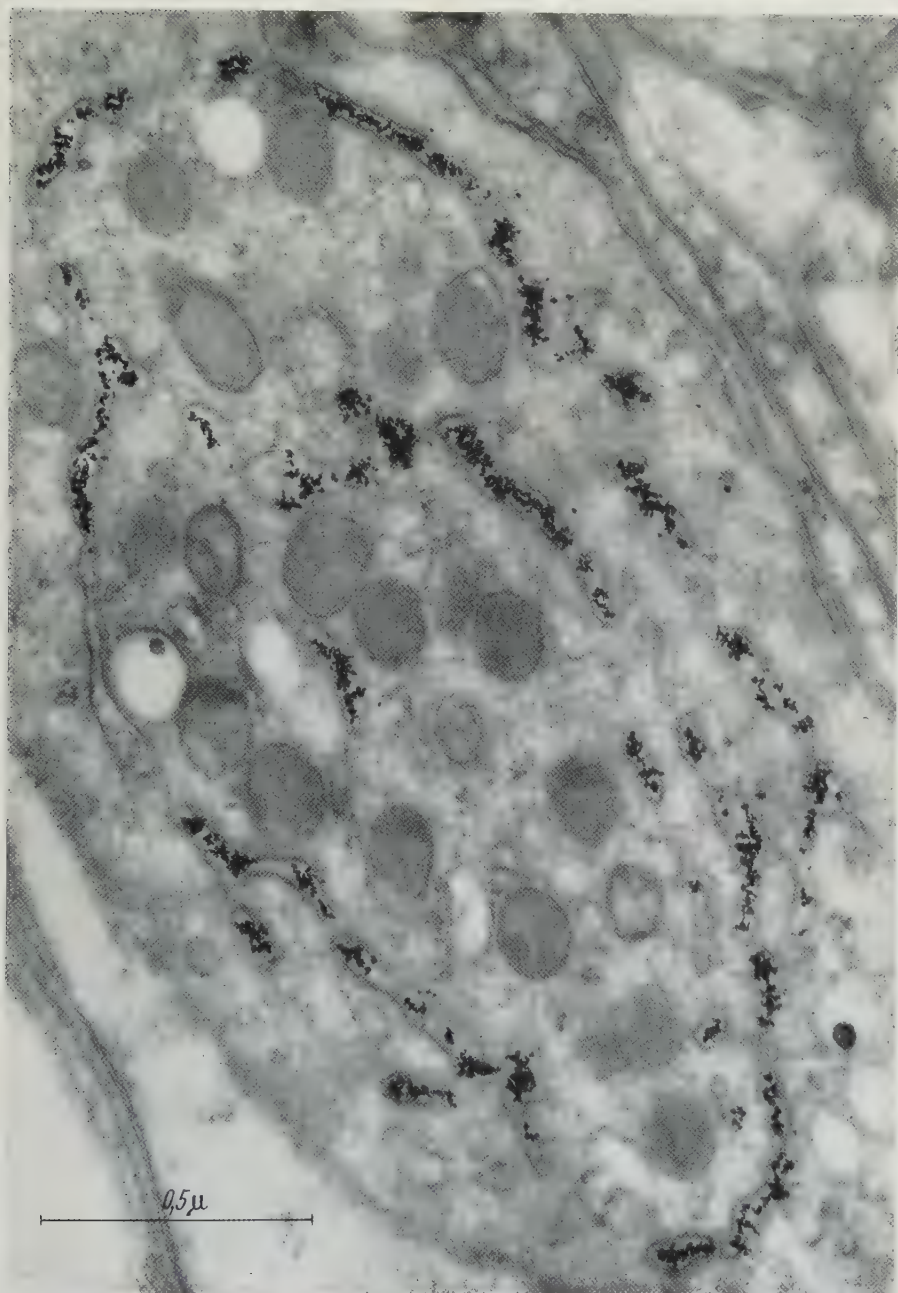


Fig. 5. Plaquette sanguine d'un lapin injecté avec du dioxyde de thorium colloïdal. Fixation 24 heures après l'injection. Nombreux tubules pleins de thorotrast dont la disposition concentrique suggère un mouvement circulaire des produits dans la cellule. Gross. 75.520 \times

auteurs ces granules sont identiques aux molécules de ferritine observées dans d'autres cellules. POLICARD et coll. (1959), qui ont étudié les plaquettes du sang du Rat, signalent également qu'ils n'ont pas observé ces granules.

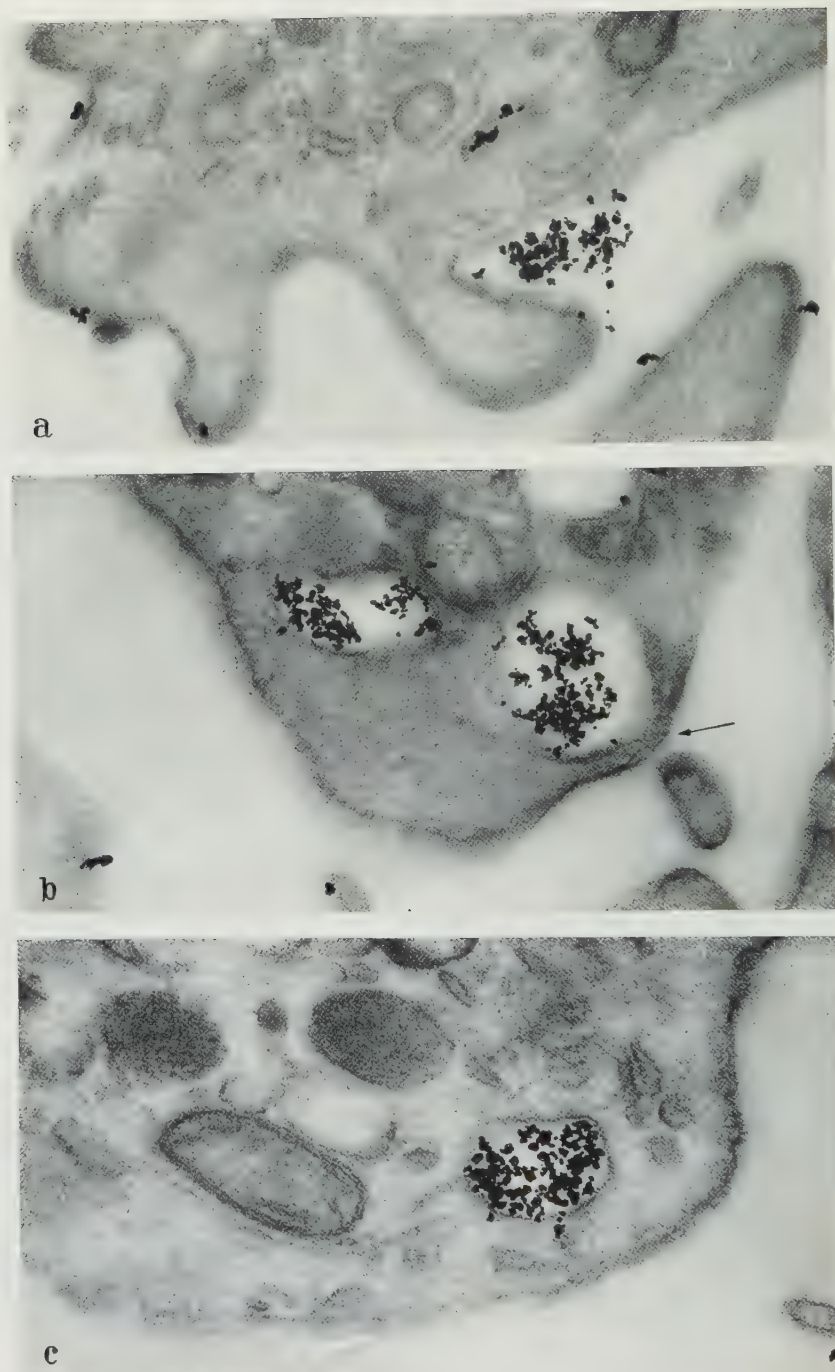


Fig. 6a—c. Plaquettes sanguines humaines mises en présence «in vitro» avec du dioxyde de thorium colloïdale. Aspects de l'incorporation du thorotrast. a Pseudopode enveloppant partiellement un groupe de particules de thorotrast. b Vacuole superficielle contenant du thorotrast. Dans la photographie originelle on reconnaît au point signalé par la flèche (\uparrow) la soudure de la membrane cellulaire. c Vacuole déjà incorporée à l'intérieur de la plaquette. Gross. 75.570 \times

Dans les plaquettes humaines isolées nous avons observé un très grand nombre de granules de 230 Å de diamètre qui dans les préparations traités à l'acétate d'uranyl, sont très évidents (Fig. 8). Dans ces préparations on peut voir que ces granules ne sont pas homogènes et qu'ils possèdent à leur intérieur des grains très denses de 30 Å de diamètre.

L'existence de petits granules dans les plaquettes a été pour la première fois signalé par BERNHARD et LEPLUS (1955) qui les ont identifié aux granules de PALADE. PEASE (1956) a décrit d'abondant granules de A. R. N. dans les plaquettes sanguines du Rat et du Cobaye. Les granules que nous avons observés dans les plaquettes humaines sont à dimensions un peu différentes et sont moins denses que les granules de PALADE.

Tous les éléments ultrastructuraux signalés dans les plaquettes des témoins ont été observés dans les plaquettes humaines isolées et mises en contact «in vitro» avec le thorotrast.

À la surface des plaquettes des animaux injectés on observe des groupements de granules très denses de thorotrast (Fig. 2). Fréquemment ces granules sont situés à l'intérieur des encoches de la surface des plaquettes, ou sont partiellement entourés par des pseudopodes (Fig. 2). Les granules de dioxyde de thorium colloïdal situés à l'intérieur des plaquettes ne sont jamais libres dans le hyalomère mais toujours situés à l'intérieur des vacuoles ou des tubules du granulomère γ (Figs. 2—6).

Nous sommes convaincus que l'existence des granules de thorotrast à l'intérieur des plaquettes rend plus évidents les éléments vacuolaires et tubulaires qui les contiennent, lesquels sont très nombreux chez les animaux injectés. Le thorotrast est incorporé à l'intérieur des plaquettes par des invaginations de la membrane cellulaire; ces invaginations se transforment ensuite en des tubules plus étroits mais identiques à ceux observés dans *Amœba proteus* après l'induction de la pinocytose (ANDRESEN et NILSSON 1960). Quelquefois les éléments tubulaires ont des aspects très particuliers, comme ceux qu'on observe dans les Figs. 2 et 5 où ils se montrent très allongés et avec une disposition concentrique très spéciale.

Dans les coupes de plaquettes humaines préalablement mises en contact «in vitro» avec du dioxyde de thorium colloïdal, on observe à la surface et adhérents à la membrane, des petits groupements de granules très denses (Figs. 6 et 7). Quelquefois ces groupements sont situés à l'intérieur des encoches de la surface des plaquettes ou partiellement entourés par des petits pseudopodes (Fig. 6a). Dans les préparations correspondantes aux plaquettes qui ont été en contact plus longtemps avec le dioxyde de thorium colloïdal (1 heure) en plus de ces images, on remarque que les composants du granulomère γ possèdent des granules de thorotrast à leur intérieur. D'une façon générale les vacuoles de ces plaquettes sont plus grandes que celles observées dans les plaquettes du poumon des lapins injectés; les éléments tubulaires ou sacculaires sont moins fréquents (Figs. 6—8).

Les images observées dans les expériences «in vivo» et «in vitro» démontrent que les plaquettes possèdent la propriété de la phagocytose. L'importance de cette propriété est mise en évidence par la grande quantité de particules observées à l'intérieur du granulomère γ de ces plaquettes.

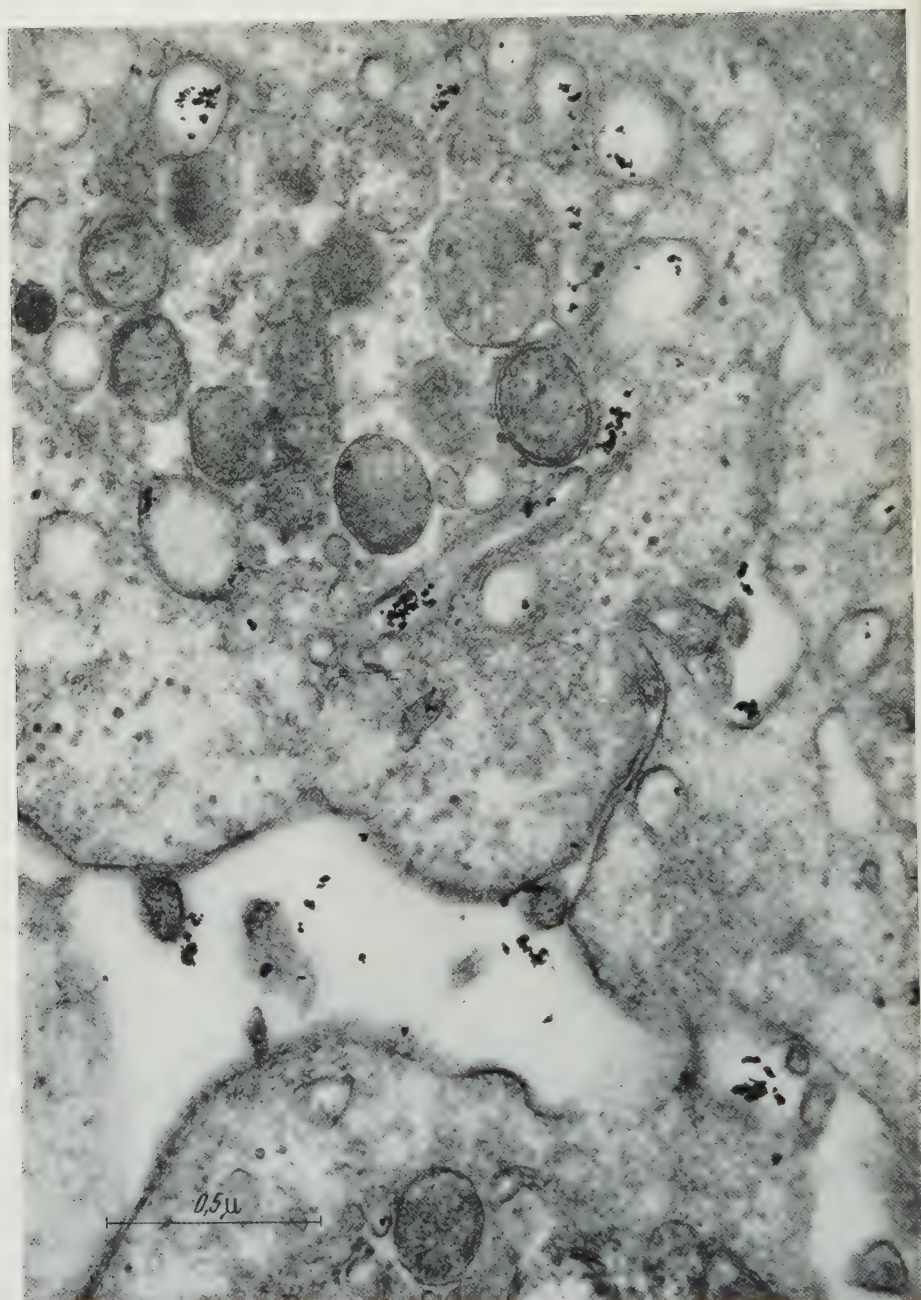


Fig. 7. Plaquette sanguine humaine mise en présence «in vitro» pendant 1 heure avec du thorotrast. Coloration à l'acétate d'uranyl. Granules de thorotrast à la surface et à l'intérieur. Dans le hyalomère on observe de nombreux granules de 230 Å très abondants dans les plaquettes isolées «in vitro». Gross. 63.400 ×

D'accord avec les différentes images décrits il est possible de conclure que les particules étrangères dans une première phase, adhèrent à la surface des plaquettes;

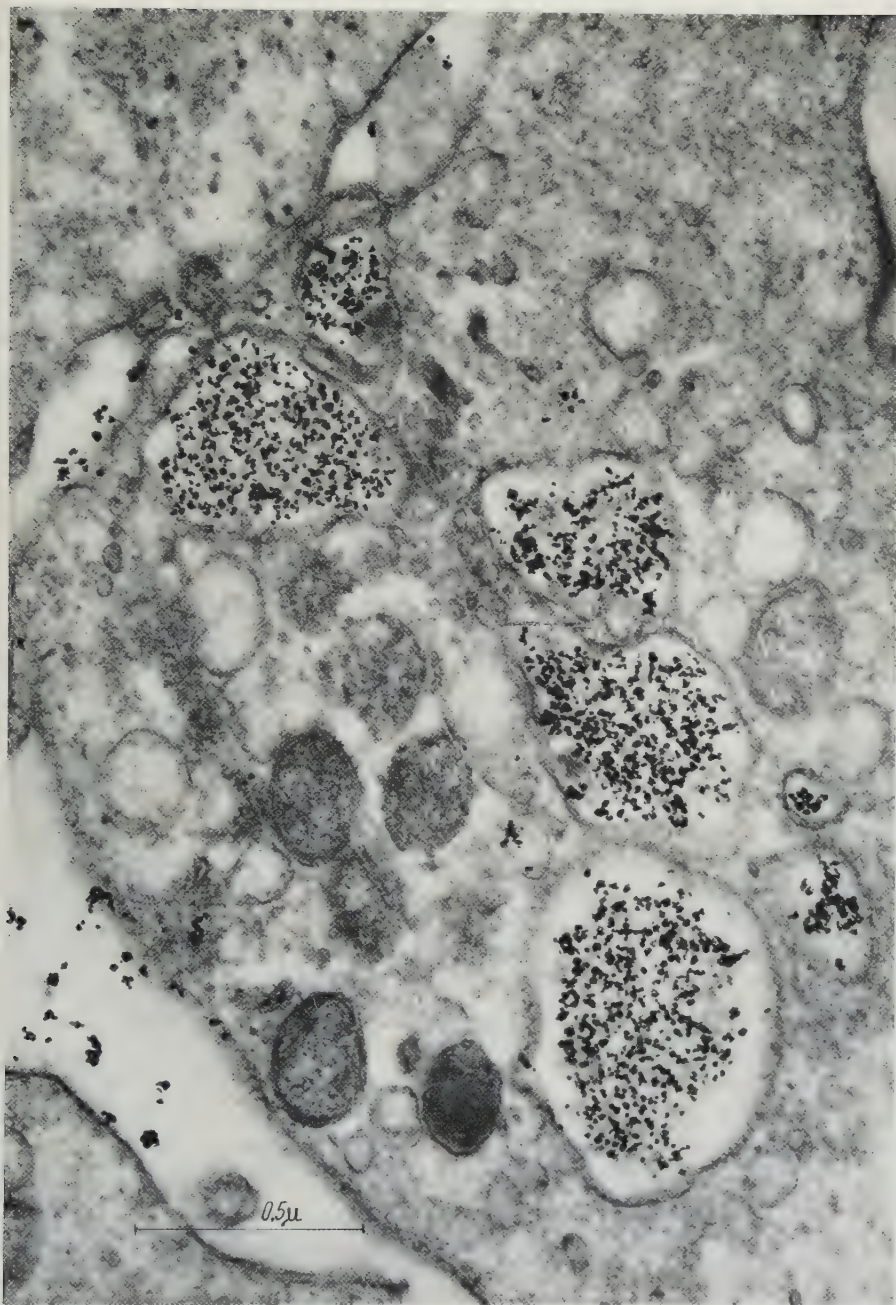


Fig. 8. Plaquette sanguine humaine mise en présence de thorotrast « in vitro » pendant une heure. Coloration à l'acétate d'uranyl. À l'intérieur du hyalomère des vacuoles qui contiennent de grandes quantités de thorotrast. Gross. 63.400.

ces particules sont ensuite entourées par les pseudopodes plaquettaire et ultérieurement incorporées à l'intérieur du hyalomère dont elles restent isolées par une membrane identique à la membrane cellulaire (Fig. 5).

Les images où l'on observe les longs éléments tubulaires ou saculaires, limités par une membrane identique à la membrane cellulaire, et dont l'intérieur est rempli de granules de dioxyde de thorium colloïdal suggèrent le mouvement des particules phagocytées, à l'intérieur des plaquettes. Ces images démontrent que dans la phagocytose du thorotrast par les plaquettes est mis en jeu un mécanisme identique à celui décrit à propos de la pinocytose.

Discussion

En 1896, CAJAL a démontré que les cellules fusiformes du sang de la Grenouille ont un grand pouvoir phagocytaire. Selon plusieurs auteurs les cellules fusiformes du sang des Vertébrés inférieurs correspondent aux plaquettes du sang des Mammifères.

La propriété phagocytaire n'a pas été démontrée jusqu'à présent dans les plaquettes du sang des mammifères mais on a reconnu en ces éléments une propriété apparentée : l'adhésivité.

BLOOM, GUSTAVSON et SWENSSON (1955) avec la technique de l'étalement ont observé au microscope électronique, que des particules de quartz mises en contact «in vitro» avec des plaquettes humaines se rassemblent à leur surface, surtout dans la région du chromomère et plus rarement dans la région du hyalomère. Dans d'autres expériences réalisées chez le Lapin, les mêmes auteurs ont observé que l'injection endoveineuse des particules inframicroscopiques de quartz était parfois suivie d'une baisse du nombre des plaquettes du sang circulant. Ces auteurs signalent que chez le Lapin l'instabilité du nombre des plaquettes ne permettait pas de tirer de cette expérience des conclusions définitives.

Nos observations réalisées sur des coupes ont permis de démontrer que dans le cas du dioxyde de thorium colloïdal il y a une incorporation de cette substance par la plaquette.

Il est probable que dans les expériences de BLOOM, GUSTAVSON et SWENSSON (1955) les particules de quartz aient été aussi incorporées par les plaquettes ; comme en cette époque ces auteurs n'employaient pas encore la méthode des coupes, il était impossible de vérifier la présence des particules à l'intérieur des plaquettes. Dans les capillaires pulmonaires du Rat, POLICARD et coll. (1955) ont étudié des thrombi plaquettaires formés après des injections intratrachéales de suspensions de silice. Ils décrivent les différents types de plaquettes observés dans ces thrombi. Au niveau des cavités alvéolaires ces auteurs ont observé des coagulats de fibrine et des tissus nécrosés qui renferment des particules de la silice injecté. Ils ne signalent pas la présence de particules de silice à l'intérieur des plaquettes.

Plus récemment DANON, JERUSHALMY et DE VRIES (1959) ont démontré que les plaquettes sanguines humaines mises en présence du virus de l'influenza présentaient quelque temps après des vacuoles contenant des particules de virus. Dans cet article les auteurs signalent ignorer le mécanisme de l'incorporation des virus dans les plaquettes.

On peut admettre que dans ce cas comme dans nos expériences avec le thorotrast, il s'agit du résultat de l'existence dans les plaquettes d'une propriété phagocytaire. Etant donné le grand nombre de plaquettes en circulation dans

le sang, cette propriété pourra jouer un rôle important dans la défense de l'organisme. Si l'on admet que, après avoir incorporé les particules étrangères, les plaquettes se desintègrent il est possible d'expliquer certaines thrombopénies observées dans diverses circonstances pathologiques comme étant une conséquence de son pouvoir phagocytaire.

Le mécanisme de la phagocytose du thorotrast par les plaquettes est identique à celui signalé par les auteurs qui ont étudié avec le microscope électronique le phénomène de la pinocytose et de la phagocytose. ANDRESEN et NILSSON (1960) qui par ce moyen ont étudié *l'Amæba proteus* après l'induction de la pinocytose par le glutamate de sodium ont observé la formation de tubules (pinocytosis channels) contenant le milieu extérieur.

Les images observées dans les plaquettes sont encore identiques à celles montrées par KARRER (1960a) dans son excellent article sur la phagocytose de l'encre de Chine par les macrophages du poumon. Comme KARRER (1960b) nous pensons que : « phagocytosis and pinocytosis are essentially identical processes and are based on the invagination and the detachment of bits of the plasma membrane, which is accompanied by the ingestion of particulates (phagocytosis) or of fluid (pinocytosis) ».

Les résultats de nos observations sur des plaquettes s'accordent avec la notion des deux mécanismes d'incorporation de substances dans la cellule proposée par BENNETT (1956) : le mécanisme de « membrane flow » que nous avons observé surtout dans les plaquettes « in vivo » et le mécanisme de « membrane vesiculation » observé surtout dans les plaquettes « in vitro ».

Lorsque la direction de la coupe est favorable et la résolution du microscope est convenable on reconnaît que la membrane des vacuoles et des éléments tubulaires qui contiennent le thorotrast est formée par les mêmes éléments que la membrane cellulaire. KARRER (1960a) a fait une observation identique dans les macrophages du poumon du Rat. Pour cette raison ANDRESEN et NILSSON (1960) n'ont reconnu aucune différence entre la membrane cellulaire et les parois des « pinocytosis channels ».

L'origine et la signification du granulomère γ des plaquettes sont encore obscures et trois interprétations ont été attribuées à ses éléments par les auteurs qui les ont étudiés :

- a) éléments d'origines golgienne,
- b) éléments du reticulum endoplasmique,
- c) vésicules de pinocytose.

La diversité des éléments qui forment le granulomère γ (vesicules, vacuoles et tubules) explique la diversité de ces interpretations et aussi la possibilité d'une origine différente de ses éléments.

Dans les observations que nous présentons on met en évidence qu'une partie de ses éléments (vacuoles et tubules) est probablement en rapport avec des phénomènes de phagocytose et pinocytose réalisés par les plaquettes. Cette interprétation qui peut expliquer l'origine des éléments vacuolaires et tubulaires du granulomère γ n'exclue pas l'hypothèse selon laquelle les microvesicules observées dans quelques plaquettes soient originaires de l'appareil de Golgi des megacaryocytes. Comme affirment FEISSLY, GAUTHIER et MARCOVICI (1958) il existe

une analogie morphologique mais «cette assimilation reste, pour l'instant, dans le domaine de l'hypothèse».

La ressemblance entre les éléments du granulomère δ de SCHULZ et coll. (1958) et les vacuoles observés par GIESEKING (1958) dans les cellules alvéolaires du poumon, après l'injection intratrachéale de l'hydroxyde de fer est impressionnante. Ce fait et la démonstration du pouvoir phagocytaire des plaquettes nous a suggéré que les éléments du granulomère δ pouvaient être aussi le résultat de la phagocytose de composés de fer. Nous tentons actuellement la vérification expérimentale de cette hypothèse. Nous n'avons aucune idée sur la nature des granules de 230 Å observés dans grand nombre des plaquettes humaines isolés «in vitro». Ils ne nous semblent pas identiques aux granules que BERNHARD et LEPLUS (1955) ont observé dans les plaquettes humaines et identifié avec les granules de Palade. Ils sont beaucoup plus grands que les granules de 120 Å observés par SCHULZ (1960) et que cet auteur a appelé „liberalisierte α -Substanz“. Dans les préparations traitées à l'acetate d'uranyl ces granules présentent encore la particularité de posséder en son intérieur des granules plus denses, de 30 Å de diamètre très évidents dans les photographies originelles. Actuellement nous n'osons pas élaborer une hypothèse sur la nature de ces granules mais nous avons été frappés par le fait de les avoir observé uniquement et en grand nombre dans les préparations des plaquettes isolés «in vitro».

Résumé

Dans cette étude on met en évidence la propriété phagocytaire des plaquettes pour des substances étrangères. Les observations ont été faites sur des coupes de tissu pulmonaire de lapins injectés par voie endoveineuse avec du dioxyde de thorium colloïdal et sur des plaquettes humaines isolées et mises en contact «in vitro» avec du dioxyde de thorium colloïdal.

La possibilité de la participation des plaquettes sanguines dans la défense de l'organisme contre certains agents est admise.

Le mécanisme de la phagocytose du thorotrast est décrit et on explique l'origine d'une partie des éléments du granulomère γ . L'auteur admet aussi l'hypothèse que les éléments du granulomère δ décrits par SCHULZ et coll. (1958) soient le résultat de la phagocytose des substances étrangères par les plaquettes.

A propos des observations réalisées sur les plaquettes humaines isolées «in vitro» l'auteur décrit des granules de 230 Å possédant en son intérieur des granules de 30 Å très évidents dans les coupes traitées à l'acetate d'uranyl.

Bibliographie

- ANDRESEN, C. C., and J. R. NILSSON: Electron micrographs of pinocytosis channels in *Amoeba proteus*. *Exp. Cell Res.* **19**, 631—633 (1960).
- BENNETT, H. S.: The concepts of membrane flow and membrane vesiculation as mechanisms for active transport and ion pumping. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl., 99—103 (1956).
- BERNHARD, W., et R. LEPLUS: La méthode des coupes ultrafines et son application à l'étude de l'ultrastructure des cellules sanguines. *J. suisse Méd.* **85**, 897—907 (1955).
- BLOOM, G.: The disintegration of human blood platelets after taking up fine quartz particles. *Z. Zellforsch.* **40**, 222—227 (1954).
- K. H. GUSTAVSON and A. SWENSSON: On the reaction of the thrombocytes to submicroscopic particles in vitro. *Acta haemat. (Basel)* **13**, 57—63 (1955).

- CAJAL, S. R.: Sobre la fagocitosis de las plaquetas. *Rev. Micrográfica* **1**, 31—37 (1896).
- DANON, D., Z. JERUSHALMY and A. DE VRIES: Incorporation of influenza virus in human blood platelets in vitro. Electron microscopical observation. *Virology* **9**, 719—722 (1959).
- FEISSLY, R., A. GAUTHIER et I. MARCOVICI: L'ultrastructure des thrombocytes du sang humain normal. *Proc. 4th Internat. Conf. Electr. Micr.*, **2**, p. 261—263. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- FERREIRA, J. F. D.: Démonstration du pouvoir phagocytaire des plaquettes sanguines chez le lapin. *Proc. European Regional Conf. Electr. Micr. Delft 1960* (in press).
- GIESEKING, R.: Aufnahme und Ablagerung von Fremdstoffen in der Lunge nach elektronenoptischen Untersuchungen. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **38**, 92—126 (1958).
- HORTA, J. S., et J. F. D. FERREIRA: En préparation (1960).
- KARRER, H. E.: Electron microscopic study of the phagocytosis process in lung. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 357—366 (1960a).
- The alveolar macrophage. *Proc. 4th Internat. Conf. Electr. Micr.* **2**, p. 415—417. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960b.
- MARCOVICI, J., et A. GAUTHIER: Liste analytique des travaux de cytologie électronique traitant de l'ultrastructure des thrombocytes. *Haematologica* **44**, 275—292 (1959).
- PEASE, D.: An electron microscopic study of red bone marrow. *Blood* **11**, 501—526 (1956).
- POLICARD, A., A. COLLET et L. GILTAIRE-RALYTE: Etude au microscope électronique de thrombiplaquettaires formés dans les capillaires pulmonaires au cours d'agressions expérimentales par des particules inframicroscopiques de silice. *Bull. Micr. appl.* **5**, 7—8 (1955).
- et S. PRÉGERMAIN: Etude infrastructurale des thrombocytes du sang circulant chez le Rat. *Bull. Micr. appl.* **9**, 26—29 (1959).
- RINEHART, J. F.: Electron microscope studies of sectioned white blood cells and platelets. *Amer. J. clin. Path.* **25**, 605—619 (1955).
- SCHULZ, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Lunge des Siebenschläfers nach Hibernation. *Z. Zellforsch.* **46**, 583—597 (1957).
- Die submikroskopische Anatomie und Pathologie der Lunge. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.
- Communication personnelle 1960.
- u. E. HIEPLER: Über die Lokalisierung von gerinnungsphysiologischen Aktivitäten in submikroskopischen Strukturen der Thrombocyten. *Klin. Wschr.* **37**, 273—285 (1959).
- R. JÜRGENS u. E. HIEPLER: Die Ultrastruktur der Thrombozyten bei der konstitutionellen Thrombopathie (v. WILLEBRANDT-JÜRGENS) mit einem Beitrag zur submikroskopischen Orthologie der Thrombozyten. *Thromb. Diath. haem.* **2**, 300—323 (1958).
- SUEYASU, T., and Y. TAGESHIGE: Electron microscopic study on the blood platelets of the rabbit. *Kurume med. J.* **3**, 114—128 (1956).
- WATSON, M. L.: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 475—478 (1958).

Dr. J. F. DAVID FERREIRA,

Laboratório de Microscopia Electrónica C. Gulbenkian,

Instituto de Histologia e Embriologia, Faculdade de Medicina, Lisboa, Portugal

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. med. W. DOERR)

MITOTISCHE WACHSTUMSINTENSITÄT DES EMBRYONALEN UND FETALEN HÜHNCHENHERZENS UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE ENTSTEHUNG VON HERZMISSBILDUNGEN * **

Von

DIETER GROHMANN

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. April 1961)

A. Einführung

Die vorliegende Arbeit enthält einen Beitrag zur Bestimmung der Wachstumsaktivität des Hühnchenherzens während aller Phasen der Entwicklung und deren Bedeutung für die Entstehung von Herzmißbildungen. Untersuchungen zur experimentellen Teratologie und Geschwulstforschung haben ergeben, daß schnell wachsende Gewebe besonders empfindlich gegenüber einer Stoffwechselstörung durch äußere oder innere Faktoren sind und mit katabiotischen Vorgängen antworten (SCHENK 1950). Unter anderem darf auch die Anzahl der Kernteilungsfiguren innerhalb eines Organs zu verschiedenen Entwicklungsperioden als Maßstab der Gefährdung gelten, während Vergleiche der Aktivität und Empfindlichkeit verschiedener Organe bzw. Organsysteme nach der Anzahl der Mitosen nur bedingt zulässig sind. Erste Untersuchungen, durch Zählung der Kernteilungsfiguren einen Anhaltspunkt über das Wachstum embryonaler Gewebe zu erhalten, gehen auf MINOT (1907) zurück. Dieser beobachtete bei Kaninchenkeimen früher Entwicklungsphasen deutliche Mitosedifferenzen in den drei Keimblättern und einen ständigen Abfall der Zellteilungen mit fortschreitendem Keimalter; ähnliche Befunde konnte SCHULTZ (1922) bei Hühnchenkeimen erheben, die auch von OLIVO und SLAVICH (1930) sowie DERRICK (1937) für einzelne Organe bestätigt wurden. In Verfolgung dieser Arbeitsrichtung lag es nahe, das relative Wachstum verschiedener Gewebe und Bezirke ein und desselben Organs zu bestimmen, um damit detaillierte Aussagen über deren Wachstumsgröße zu gewinnen, wie dies von HAMBURGER (1948) für das Rückenmark durchgeführt und von KL. GOERTTLER (1956b) für das Herz begonnen wurde. Wir haben die Untersuchungen von KL. GOERTTLER fortgesetzt und abgeschlossen, um die „sensible Periode“ der Herzentwicklung gegenüber schädigenden Agentien festzulegen.

Die durchgeführte Analyse am Hühnchenkeim gilt als Paralleluntersuchung für direkte Bestimmungen der Empfindlichkeit durch das Experiment und verfolgt mit jenen das Ziel, die im Prinzip ähnlich ablaufende normale und abartige Entwicklung des menschlichen Herzens weiter aufzuklären. Beabsichtigt ist dabei eine Überprüfung neuerer Ansichten über die Bedeutung der Herzgewebe Endokard und Myokard für die Teratogenese des Herzens (SHANER 1949, DOERR 1955, GOERTTLER 1955 und 1956a). Während SHANER in Übereinstimmung mit

* Unter Leitung von Priv.-Doz. Dr. med. KL. GOERTTLER.

** Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

älteren Ansichten von PERNKOPF und WIRTINGER (1935) dem Endokard eine entscheidende entwicklungsmechanische Bedeutung beimißt und in der Ausbildung eines „luxurierenden Endokardkissens“ das ursächliche Moment für die Entstehung von Entwicklungsstörungen am arteriellen Herzende sieht, äußert sich DOERR (1952 und 1955) kritisch gegenüber der Eigengesetzlichkeit des Endokard und weist darauf hin, daß Mißbildungen wie die Transposition der großen Gefäße und wesensmäßig gleichartige Herzfehler wie Eisenmenger-Komplex mit „reitender“ Aorta und Taussig-Bing-Syndrom mit „reitender“ Pulmonalis nicht auf einem pathologischen Verlauf des embryonalen Septum bulbi et trunci beruhen; die Zuordnung der großen Gefäße zu den jeweiligen Herzkammern sei vielmehr abhängig vom Ausmaß des Bewegungsablaufes am Bulbotruncus, und die Arretierung eben dieser „vektoriellen Bulbusdrehung“ bedinge die Mißbildung. Gegen einen determinierenden Einfluß der Endokardleisten sprechen auch die Ergebnisse von Durchströmungsversuchen an Glasmodellen normal und abnorm gestalteter embryonaler Herzanlagen (BREMER 1931/32, KL. GOERTTLER 1955, ROMHÁNYI 1952), die zeigen, daß nicht die plastischen und leicht verformbaren Septumleisten den Blutstrom derart lenken, daß eine Umschlingung von Aorta und Pulmonalis resultiert, sondern umgekehrt der Blutstrom die Lage der endokardialen Gebilde beeinflußt. So ist nach KL. GOERTTLER (1955) die Bildung und Fehlbildung des Endokard nicht Ursache, sondern Folge eines durch äußere oder innere Faktoren hervorgerufenen abartigen Geschehens am Myokard und einer hiermit verbundenen Änderung der hämodynamischen Verhältnisse; für die Entstehung einer Mißbildung sei folglich eine Deformation des embryonalen Herzschlauches verantwortlich.

Im Experiment konnten Herzmißbildungen von FOX und GOSS (1956, 1957 und 1958), KL. GOERTTLER (1959), SCHELLONG (1954) und WEGENER (1961) durch Schädigung der Keime während früher Entwicklungsperioden erzeugt werden. Über den Entstehungszeitpunkt einiger Deformationen bestehen keine Meinungsverschiedenheiten, dagegen ist die Frage der Bedeutung der Herzgewebe noch umstritten. Trifft die Annahme einer primär entscheidenden Rolle des Myokard zu, muß auch eine erhöhte Schädigungsbereitschaft infolge starker Wachstumsintensität durch Bestimmung der Mitosequote nachweisbar sein, deren Änderung während verschiedener Phasen der Herzentwicklung dann mit einer Änderung der Empfindlichkeit gegenüber schädigenden Einflüssen verknüpft sein dürfte.

Es ist die besondere Aufgabe dieser Arbeit, die Wachstumsrelationen von Myokard und Endokard und der einzelnen Herzteile zueinander während der Embryonal- und Fetalentwicklung aufzudecken, hiermit einen Beitrag zur Stoffwechseltopographie des Hühnchenherzens zu liefern und die Diskussion über die formale und zeitliche Entstehung von Herzmißbildungen zu vertiefen.

B. Material und Methoden

I. Art, Umfang und Aufarbeitung des Untersuchungsgutes

Als Grundlage der Untersuchung dienten histologische Präparate von 47 Hühnchenherzen des 2.—20. Bebrütungstages (Schnittserien der Herzen vom 2.—12. und Stufenschnitte vom 14.—20. Tag). Bis zum 5. Tag der Bebrütung wurden Keime in sechsstündigen Kontrollen aus den Eiern entnommen, in den folgenden Tagen in einem Abstand von 24 Std und in den letzten Tagen vor dem Schlupf alle 48 Std. Fixiert wurde anfangs in Carnoy-Gemisch, um eine brauchbare Methylgrün-Pyronin-Färbung (UNNA-PAPPENHEIM) zu erreichen. Später

ergab sich bei etwas abgeänderter Fragestellung, daß die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin ein ebenso leichtes und genaues Auszählen der Mitosen gestattete. Da hierbei die besonders bei Serienschritten störenden Unterschiede im Gelingen der Methylgrün-Pyronin-Färbung vermieden werden konnten, wurde diese Färbung vorgezogen. Geringe Schrumpfung und eine gute Färbbarkeit der Gewebe wurden mit der für embryonale Strukturen besonders brauchbaren Fixierung nach TELLYESNICZKY (PATTEN und PHILPOTT 1920/21, ROMEIS 1948) erreicht. Das von uns ausgewertete Untersuchungsgut umfaßt über 50000 histologische Serien- und Stufenschnitte (Schnittstärke $5\ \mu$).

Trotz gleicher Zucht und Rasse (weiße Leghorn) schwankte die Größe der entnommenen Herzen in den ersten Entwicklungstagen teilweise recht erheblich. Die Herzanlagen waren allgemein etwas weniger entwickelt als es nach den von PATTEN (1922) angegebenen Normen zu erwarten war. Die auch hier in Erscheinung tretende Streubreite eines jeden biologischen Untersuchungsgutes — unter anderem vielleicht eine Folge der ungleichen Verweildauer der Eier im Eileiter vor ihrer Ablage — veranlaßte uns, einmal die Schnittserien von drei Herzen für jeden Bebrütungstag auszuwerten; zum anderen waren exakte und umfangreiche Zählungen erforderlich, um ein möglichst umfassendes und ausgeglichenes Material zu erhalten und die Ergebnisse hernach auch statistisch sichern zu können. Es wurde deshalb in Weiterführung der Mitosebestimmungen von KL. GOERTTLER (1956b) dessen Zahlenmaterial (190000 Zellen) neben einer bisher nicht ausgewerteten Untersuchungsreihe von G. ROSENBUSCH (60000 Zellen) in Tabellen und Statistik übernommen. Bei einem Gesamtumfang von nunmehr insgesamt 720000 Zellen steht ein den statistischen Forderungen hinreichend genügendes Zahlenmaterial zur Verfügung.

Die Zählungen wurden anfänglich von GOERTTLER und ROSENBUSCH unter Verwendung eines Zeichenspiegels durchgeführt; im weiteren Verlauf der Untersuchung erlaubte die Verwendung des Projektionsmikroskopes „Lanameter“ der Firma Reichert (Wien) eine wesentliche Vereinfachung der Auszählungen. In regelmäßigen Abständen wurden histologische Schnittpräparate von der Herzbasis bis zur Herzspitze ausgewertet, und bei einer Endvergrößerung von 1:1100 bereitete es keine Schwierigkeiten, sämtliche Zellen einer Region unter besonderer Kennzeichnung der jeweils gefundenen Mitosen mit einer tuschegefüllten Trichterfeder auf ein Cellophanpapier — das auf die Projektionsfläche des „Lanameters“ aufgelegt war — „durchzupausen“ und anschließend auszuzählen. Die durchschnittlich abgezeichnete Zellzahl in einem Mikroskopierfeld betrug dabei 30 Zellen.

Bei Herzanlagen früher Entwicklungsstadien wurden die Wandungen beider Kammern und Vorhöfe mit jeweiliger Trennung in rechts- und linksseitige Herzteile in ihrem gesamten Umfang ausgezeichnet; entsprechend auch Kammersepten und Endokardkissen. Bei größeren Herzen beschränkten wir uns auf das Auszeichnen größerer Abschnitte jeweils ventral, dorsal und lateral.

Als Mitosen wurden nur diejenigen Zellen gewertet, die auf Grund ihrer Zellgröße, der Menge und Verteilung des Chromatins eine sichere und eindeutige Abgrenzung von einer ruhenden Zelle erlaubten; bei gleichmäßig und nicht zu intensiv angefärbten Schnittserien ergaben sich hierbei auch bei der HE-Färbung keine wesentlichen Schwierigkeiten, wenngleich die Anfärbbarkeit der während der Mitose im Chromatin verdichteten Desoxyribosenukleinsäuren mit der Methylgrün-Pyronin-Färbung prinzipiell geeigneter erscheint. Dieser Vorteil wird jedoch durch die eingangs erwähnten technischen Nachteile wieder ausgeglichen, zumal die einfachere HE-Färbung bei kräftiger und gleichmäßiger Anfärbung ein ebenso rasches und leichtes Auszählen gestattet. Mit Ausnahme einiger Keime der ersten Bebrütungstage wurden daher sämtliche Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

II. Statistische Prüfverfahren¹

Zur Beurteilung der Aussagekraft der mit dieser Methode gewonnenen Resultate und um etwaige, zwar unbeabsichtigte, aber systematische Fehlerquellen weitmöglich auszuschalten, haben wir unsere Ergebnisse mathematisch-statistisch geprüft.

¹ Für wertvolle Ratschläge und kritische Durchsicht der statistischen Auswertung bin ich Herrn Prof. Dr. A. PROPE (Direktor der Universitäts-Hautklinik Kiel) und Herrn Priv.-Doz. Dr. R. ULLRICH (Mathematisches Institut der Universität Kiel) zu besonderem Dank verpflichtet.

Geht man von der Annahme aus, daß die Wachstumsaktivität eines in der Entwicklung befindlichen Organs im wesentlichen der Mitosehäufigkeit parallel verläuft, dann müssen bei Wachstumsdifferenzen auch unterschiedliche, durch Mitosezählungen erfaßbare Mitosequoten vorhanden sein. Bei kritischer Bewertung der durch solche Zählungen gefundenen Differenzen kommt es nun darauf an, in bezug auf den Sachverhalt lediglich zufällige von wesentlichen Befunden zu unterscheiden. Die Gefahr, einen gefundenen Unterschied fälschlicherweise schon für einen Beweis der These zu halten, ist um so größer, je breiter die natürliche Varianz des Objektes im Einzelfalle streut. Geeignete mathematisch-statistische Methoden erlauben jedoch eine Kennzeichnung des Sicherheitsgrades, mit dem man bei gegebenem Materialumfang eine gefundene Differenz von der natürlichen Streuung unterscheiden kann. Unter dem Einfluß der angelsächsischen Literatur begnügt man sich dabei oft schon mit einer Irrtumsmöglichkeit von 1%. In Deutschland war es üblich, die Aussagen erst als „signifikant“ zu bezeichnen, wenn die Irrtumsmöglichkeiten geringer als 0,27% — die 3σ -Grenze — sind.

Als Prüfverfahren bieten sich einmal das Prüfen von Mittelwerten als t -Test nach STUDENT an, zum anderen das bei der Größe und Zusammensetzung unseres Untersuchungsmaterials naheliegende Prüfen von Häufigkeitsziffern. Letzteres bietet den Vorteil einer leichteren Auswertung und wurde deshalb vorgezogen.

Die Größe einer Irrtumsmöglichkeit von 1% ist dann gegeben, wenn der Quotient aus der Differenz der beiden Häufigkeitsziffern (D) und der mittleren Streubreite der Differenz (s_D) größer ist als 2,58:

$$\frac{D}{s_D} = > 2,58.$$

Soll die Irrtumsmöglichkeit kleiner als 0,27% sein, so muß die Differenz größer als ihr dreifacher mittlerer Fehler sein:

$$\frac{D}{s_D} = > 3.$$

Die mittlere Streubreite s_D ergibt sich nach der Bernoulli-Formel mit

$$s_D = \sqrt{p \cdot (1-p) \cdot \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

Der Wert für p als geschätztes „gewogenes arithmetisches Mittel“ wird rechnerisch aus der Anzahl der Mitosen (z) und dem Umfang der Zellzählungen (n) mit

$$p = \frac{z_1 + z_2}{n_1 + n_2}$$

ermittelt.

Das Gesetz der Zahl wird sich um so eher erfüllen, je größer die bezogene Masse ist. Der Gesamtumfang unserer Untersuchungsreihen beträgt 720000 ausgezeichnete Zellen. Es war uns möglich, für fast alle erhobenen Befunde Irrtumsmöglichkeiten unter 0,27% (3σ -Grenze) zu errechnen.

Die statistisch signifikanten Mindestzellzahlen (N) im Ergebnisteil dieser Arbeit wurden nach dem „Gesetz der großen Zahlen“ errechnet. Es ergibt sich hierfür bei einer Irrtumsmöglichkeit von 1%

$$N = \left(\frac{2,58}{D} \right)^2 \cdot p \cdot (1-p)$$

und bei einer Irrtumsmöglichkeit von 0,27% (3σ -Grenze) ein Wert von

$$N = \left(\frac{3}{D} \right)^2 \cdot p \cdot (1-p).$$

Für p wurde der jeweils höchste beobachtete Häufigkeits(Mitose)wert innerhalb der mehrere Keime umfassenden Untersuchungsreihen eingesetzt, um eine gewisse „Zuschlagsrate“ zu erhalten.

C. Ergebnisse

Den hier mitgeteilten Ergebnissen liegt eine Bestimmung der Mitosequoten des Myokard von Kammer, Vorhof und Kammerseptum sowie des Endokard der Bulbus- und Ohrkanalkissen vom 2.—20. Bebrütungstag zugrunde. Zuerst soll über die Ergebnisse nach Zählung der Kernteilungsfiguren im Myokard berichtet werden.

I. Messungen am Myokard

a) *Mitosezählungen im parietalen Myokard der Kammern.* Verfolgt man den prozentualen Anteil der Kernteilungsfiguren im Myokard der Herzkammer-

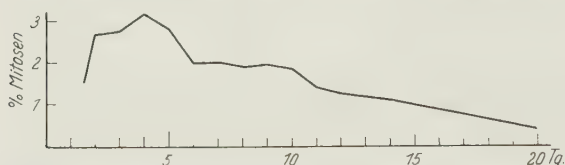


Abb. 1. Graphische Darstellung des mitotischen Wachstums- geschehens im ventrikulären Myokard während der Embryonal- und Fetalentwicklung, s. auch Tabelle 1

Tabelle 1. *Mitotische Wachstumsaktivität im Myokard des embryonalen und fetalen Hühnchenherzens. Angabe der absoluten Zellzahlen, der prozentualen Häufigkeit sowie der Streubreite der jeweils ausgewerteten Keimlinge. Die Werte für den 2.—5. Bebrütungstag wurden durch Zusammenfassung von 6- bzw. 12 Std.-Werten erhalten. Die für die 36. Bebrütungsstunde angegebenen Mitosequoten sind wegen der geringen Größe der Objekte und der deshalb geringen Zellzahlen für Kammer- und Vorhofmyokard gemeinsam bestimmt worden*

Bebrütungs- tag	Gezählte Zellkerne		Mitosen %	Mittlere prozentuale Mitosedifferenz der einzelnen Keime
	insgesamt	Mitosen		
1 $\frac{1}{2}$	860	13	1,5	—
2.	8800	235	2,65	0,65
3.	21080	578	2,75	0,22
4.	42150	1331	3,15	0,28
5.	34670	968	2,8	0,14
6.	54180	1073	2,0	0,14
7.	43750	691	2,0	0,16
8.	25640	490	1,9	0,12
9.	50880	992	1,95	0,28
10.	14130	263	1,85	0,26
11.	15270	212	1,4	0,07
12.	17070	210	1,25	0,11
14.	9490	104	1,1	0,35
16.	9330	80	0,85	0,15
20.	4300	17	0,4	—
	342600	7257	—	0,23

wicklungsperiode kann als Primärphase der Herzentwicklung bezeichnet werden; in ihr wird die äußere Herzform ausgebildet.

Nach Abschluß der „Primitiventwicklung“ und Umlagerung der Herzscheife am 4.—5. Bebrütungstag sinken während der nun einsetzenden Septation mit

wandungen während der ersten Bebrütungstage, so ist in diesem frühen Entwicklungsstadium mit dem Auftreten der ersten Muskelkontraktionen um die 35.—45. Std. auch eine vermehrte Zellteilung zu beobachten, wie in Tabelle 1 und Abb. 1 dargestellt ist. Dieser Mitoseanstieg am 2. Bebrütungstag ist jedoch wegen des geringen Umfangs der Zellzählungen — geringe Größe der Herzanlagen — und der gerade in dieser frühesten Entwicklungsphase erheblichen Variationsbreite der einzelnen Keime nur mit Zurückhaltung zu beurteilen; die Irrtumswahrscheinlichkeit, die sich aus den vorhandenen Zahlen berechnet, ist größer als 1%. — Für die ersten Stunden der Herzentwicklung ergeben sich Mitosewerte von 2,65% (48. Std.), die weiterhin leicht ansteigen und am 4. Tag mit 3,15% ein Maximum erreichen. Diese durch rege mitotische Aktivität ausgezeichnete Ent-

definitiver Ausbildung einer rechten und linken Herzkammer die Mitoseraten am 5. und besonders am 6. Tag auf Werte von 2% ab. Sehr eindrucksvoll ist der Mitoserückgang vom 5. auf den 6. Tag. Er erscheint völlig zweifelsfrei, denn selbst wenn man ihn unabhängig von dem vorhergehenden und nachfolgenden Kurvenverlauf, d.h. einer eingegebenen Entwicklungstendenz, an Hand der vorgelegten Zahlen mathematisch-statistisch betrachtet, so ist die beobachtete Differenz 7,75mal größer als ihr mittlerer Fehler (bei einem Quotient von 4 ist die Wahrscheinlichkeit bereits 99,9936 % groß!). — Auch der Mitoseabfall vom 4. auf den 5. Tag hat mit $\frac{D}{s_D} = 2,9$ einen Wahrscheinlichkeitswert von 99,62%.

Das am 6. Tag der Bebrütung erreichte Mitose-Niveau wird bis zum 10. Tag im wesentlichen gehalten. Im weiteren Verlauf der Entwicklung nimmt mit zunehmender Differenzierung die Mitoseaktivität stetig ab bis auf 0,4% einen Tag vor dem Schlupf. Für diesen Rückgang konnten folgende Werte für $\frac{D}{s_D}$ ermittelt werden: 10.—11. Tag = 3,2; 11.—16. Tag = 3,2; 16.—20. Tag = 2,9.

Die oben angeführten Mitoseraten ergaben sich durch Zusammenfassung der in Tabelle 2 und Abb. 2 getrennt für die linke und rechte Herzkammerwandung aufgeführten Einzelwerte. Für die Spanne vom 4.—10. Bebrütungstag ist keine generell stärkere Wachstumsaktivität einer Herzkammer nachzuweisen, während vom 10.—16. Bebrütungstag ausnahmslos eine höhere mitotische Aktivität in den linkskammerigen Abschnitten festzustellen ist. Unter Zusammenfassung der Einzelwerte des 10.—16. Bebrütungstages darf diese Be-

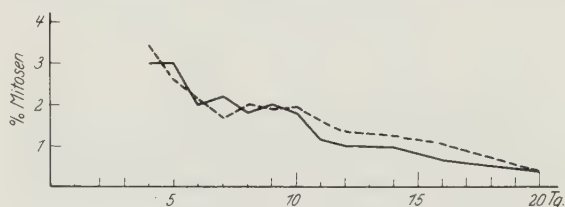


Abb. 2. Kurvenmäßiger Ablauf der mitotischen Aktivität im rechts- und linkskammerigen Myokard. ——— Rechter Ventrikel; - - - - - linker Ventrikel. Siehe auch Tabelle 2

Tabelle 2. Getrennte Aufführung der Mitosequoten von rechter und linker Herzkammerwand

Bebrütungs- tag	Rechte Kammer		Linke Kammer	
	Zellzahl	Mitose %	Zellzahl	Mitose %
4.	4490	3,0	4580	3,45
5.	7240	3,0	7360	2,6
6.	20870	2,0	14650	2,15
7.	18750	2,2	15990	1,7
8.	13210	1,8	12440	2,0
9.	24680	2,0	26220	1,9
10.	7090	1,8	7040	1,95
11.	7670	1,15	7590	1,6
12.	8440	1,0	9470	1,35
14.	6960	1,0	6130	1,25
16.	4320	0,65	5010	1,05
	123710	—	116470	—

obachtung mit $\frac{D}{s_D} = 3,6$ als gesichert gelten. Im übrigen wurde ein stärkeres Wachstum bestimmter Kammerteile (z.B. der Herzspitze) nicht beobachtet.

b) *Mitosebestimmung im Myokard der Vorhöfe.* Die an der Vorhofmuskulatur in gleicher Weise wie im Kammermyokard für die rechte und linke Herzhöhle getrennt durchgeführten Mitosezählungen (Tabelle 3) erlauben nach ihrer Zusammenfassung eine kurvenmäßige Darstellung, die weitgehend der des Ventrikels ähnelt (Abb. 3). Mit dem 2. Bebrütungstag nehmen auch in diesem Herzteil die Mitosen mengenmäßig zu; der Anstieg ist jedoch weniger stark ausgeprägt als

der des Ventrikelmyokard. Bis zum 4. Tag, an dem die großen Gestaltungsbewegungen des Herzrohres abgeschlossen sind, läßt sich ein gleichbleibend hohes Niveau um 2,2% nachweisen. Mit Beginn der Septation sinkt die Mitoseaktivität wie im Myokard der Ventrikel beträchtlich ab und erreicht am 6. Tag einen Wert um 1%. Der Mitoserückgang ist mathematisch-statistisch signifikant ($\frac{D}{s_D} = 5,4$ für den 4./5. Tag und 5,8% für den 5./6. Tag). Während des leicht wellenförmigen

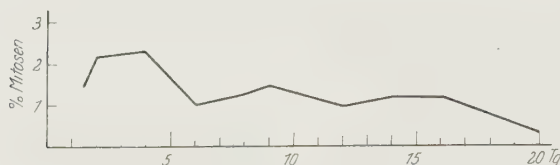


Abb. 3. Graphische Wiedergabe der Mitoseaktivität im Myokard der Vorhöfe. Siehe auch Tabelle 3

Tabelle 3. Mitosehäufigkeit im Myokard der Vorhöfe. Die Werte für den 2.—5. Bebrütungstag wurden durch Zusammenfassung von 6- bzw. 12 Std.-Werten erhalten. Der für die 36. Bebrütungsstunde aufgeführte Mitosewert ist für Kammer- und Vorhofmyokard gemeinsam bestimmt worden (s. Legende zu Tabelle 1)

Bebrütungs- tag	Gezählte Zellkerne		Mitose %	Mittlere prozentuale Mitosedifferenz der einzelnen Keime
	insgesamt	Mitosen		
1 1/2	860	13	1,5	—
2.	8610	186	2,15	0,35
3.	25160	557	2,2	0,15
4.	32780	745	2,3	0,12
5.	25600	422	1,65	0,23
6.	24830	262	1,05	0,3
7.	10860	123	1,15	0,49
8.	9240	118	1,3	0,29
9.	11740	175	1,5	0,28
10.	10840	146	1,35	0,22
11.	11060	135	1,2	0,52
12.	13350	136	1,0	0,06
14.	8330	103	1,25	0,23
16.	7990	99	1,25	0,25
20.	2000	8	0,4	—
	203220	3228	—	0,27

erhaben; die Differenzen nach Zusammenfassung der Einzelwerte des 5.—9. Tages einerseits und des 12.—16. Tages andererseits sind um das 4,18fache bzw. 3,05fache größer als ihre mittleren Fehler.

c) Mitosequoten des septalen Myokard der Herzkammern. Für das parietale Myokard der Kammern und der Vorhöfe ist eine rege Mitoseaktivität in der ersten Entwicklungsperiode charakteristisch. Demgegenüber liegen die entsprechenden Werte für das Myokard des sich entwickelnden Kammerseptum zunächst auffallend niedrig (Tabelle 5 und Abb. 5). Erst vom 6. auf den 8. Bebrütungstag ist ein signifikanter Anstieg um fast 1% festzustellen ($\frac{D}{s_D} = 5,6$). Es wird dann

Verlaufes in den folgenden Tagen ergibt sich gegen den 9. Tag der Bebrütung eine geringfügige Erhöhung und gegen den 12. Tag ein entsprechendes Absinken der Mitosen. Es kann somit ein um 1,2% schwankendes Niveau bis zum 16. Tag angenommen werden. Gegen Ende der Bebrütungszeit fällt die Mitosequote bis auf 0,4% einen Tag vor dem Schlupf ab ($\frac{D}{s_D} = 3,28$).

Eine Gegenüberstellung der Werte für den rechten und linken Vorhof (Tabelle 4) läßt augenscheinlich werden, daß in der ersten Entwicklungshälfte eine höhere mitotische Aktivität der rechten, nach dem 10. Tag jedoch eine solche der linken Vorhofswandung vorliegt (Abb. 4). Diese Beobachtung der unterschiedlichen Wachstumstendenz der beiden Vorhöfe ist über den Zufall

ein Niveau erreicht, das zwar dem des parietalen Ventrikelmyokard zu jenem Zeitpunkt entspricht, dennoch aber weit unter den für Ventrikel- und Vorhofmuskulatur zu Beginn der Herzentwicklung errechneten Werten liegt. Innerhalb der folgenden Tage wird dieses Niveau nur unwesentlich verändert — die erhaltenen Quoten stellen lediglich Schwankungen im Bereiche der jedem biologischen Untersuchungsgut anhaftenden Streubreite dar — und erst am 12. Tag der Bebrütung ist ein langsamer Rückgang der Mitosezahl feststellbar. Der weitere Verlauf deckt sich vollkommen mit dem des parietalen Ventrikelmyokard.

d) *Vergleich und Zusammenfassung der Mitosequoten von parietalem Myokard der Kammern und Vorhöfe und septalem Kammermyokard.* Zum besseren Vergleich und sicherer Abgrenzung der in den ersten Entwicklungsphasen stark differierenden Mitoseraten in den einzelnen Herzmuskelabschnitten sind die Mitosekurven des Myokard in Abb. 6 zusammengestellt worden.

Ein Vergleich der Mitosequoten des Kammer- und Vorhofmyokard in der ersten Entwicklungshälfte zeigt augenscheinlich einen

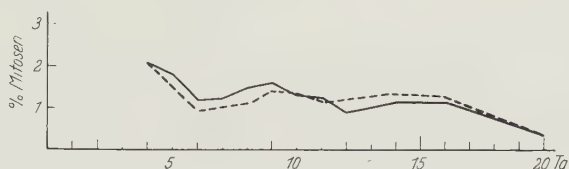


Abb. 4. Ablauf der mitotischen Aktivität im Myokard des rechten und linken Vorhofes (ausgezogene bzw. unterbrochene Linie). Siehe auch Tabelle 4

Tabelle 4. *Mitoseraten im Vorhofmyokard für die rechts- und linksseitigen Anteile*

Bebrütungs- tag	Rechter Vorhof		Linker Vorhof	
	Zellzahl	Mitose %	Zellzahl	Mitose %
4.	4720	2,05	3390	2,05
5.	6360	1,8	5730	1,1
6.	5930	1,2	5690	0,95
7.	5760	1,25	5100	1,0
8.	4410	1,5	4820	1,1
9.	6260	1,6	5450	1,4
10.	5540	1,3	5310	1,35
11.	5280	1,25	5790	1,15
12.	6550	0,8	6790	1,25
14.	4590	1,15	3740	1,35
16.	3900	1,15	4130	1,35
	60300	—	55640	—

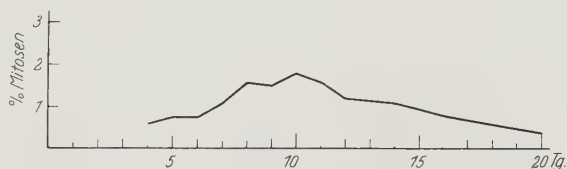


Abb. 5. Graphische Darstellung der mitotischen Wachstumsintensität im Myokard des Septum ventriculorum. Siehe auch Tabelle 5

Tabelle 5. *Mitotische Aktivität des septalen Kammermyokard*

Bebrütungs- tag	Gezählte Zellkerne		Mitose %	Mittlere prozentuale Mitosedifferenz der einzelnen Keime
	insgesamt	Mitosen		
4.	2290	14	0,6	0,14
5.	4810	37	0,75	0,22
6.	19280	147	0,75	0,48
7.	5640	61	1,1	0,41
8.	6960	111	1,6	0,29
9.	7940	118	1,5	0,34
10.	4980	90	1,8	0,88
11.	5930	94	1,6	0,26
12.	6180	72	1,2	0,09
14.	6730	75	1,1	0,22
16.	6600	52	0,8	0,13
20.	2430	10	0,4	—
	79770	881	—	0,27

gleichartigen Kurvenverlauf, der lediglich in der *Höhe* der Werte differiert; der muskelschwächere Vorhof weist hierbei generell um 0,5—1% niedrigere Quoten auf. Statistisch ist diese Differenz bis zum 10. Tag signifikant (s. Tabelle 6). Lediglich am 2. Bebrütungstage kann für die Realität dieses Niveauunterschiedes nur eine Wahrscheinlichkeit von 97,1% errechnet werden, einmal

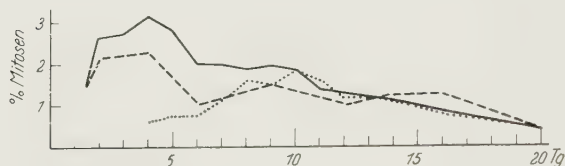


Abb. 6. Ablauf der Wachstumsaktivität in einzelnen Abschnitten des Myokard. — Parietales Kammermyokard; septales Kammermyokard; ---- Vorhofmyokard

wegen des geringeren Umfanges der Zellzählungen — geringe Größe der Herzanlagen —, zum anderen wegen der gerade in diesem frühen Stadium erheblichen Streubreite: während die mittlere Differenz der einzelnen zur Auswertung gelangten Keime durchschnittlich 0,25% beträgt, liegen am 2. Bebrütungstag die Werte deutlich höher. — Nach dem 10. Tag der Bebrütung ist eine Differenz der beiden Herzabschnitte nicht mehr festzustellen; die Kurven konvergieren, wobei erst die Mitosen im Kammermyokard seltener werden. Nach dem 16. Tag fallen auch die Werte für das Vorhofmyokard allmählich auf einen gemeinsamen Endwert um 0,4% einen Tag vor dem Schlupf ab.

Tabelle 6. Statistische Signifikanzen für den Kammer-Vorhofunterschied des Myokard in der ersten Entwicklungshälfte sowie errechnete Mindestzellzahlen bei einer Sicherheitsgrenze von 99%; die Zahlen beziehen sich jeweils auf eine der beiden abzugrenzenden Untersuchungsreihen

Bebrütungstag	Mitosedifferenz	$\frac{D}{s_D}$	Errechnete Mindestzellzahl je Untersuchungsreihe unter Zugrundelegung einer Sicherheitsgrenze von 99%
2.	0,5	2,18	—
3.	0,55	2,6	8200
4.	0,85	7,18	2900
5.	1,15	9,2	1600
6.	0,95	9,5	1900
7.	0,85	5,92	2200
8.	0,6	4,0	3500
9.	0,45	3,14	6400
10.	0,5	3,15	5200

— 4,57 bzw. 3,15). Erst am 8. Tag wird ein Niveau erreicht, das keine statistische Abgrenzung gegen das übrige Kammermyokard mehr erlaubt, und vom 10. Tage an sind die Mitosezahlen gleich hoch. Demnach werden in keiner Phase der Entwicklung im Septummyokard ähnlich hohe Quoten wie im parietalen Myokard in den ersten 5 Bebrütungstagen erreicht.

Damit haben unsere Untersuchungen ergeben, daß sich das Myokard von Kammer und Vorhof gleichartig und synchron entwickelt, wobei allerdings eine charakteristische, verschieden hohe Mitoseaktivität in den ersten Stadien beob-

Die Teilungsaktivität im muskulären Kammerseptum folgt einem anderen Modus. Eine Übereinstimmung mit den Werten für das parietale Kammermyokard und die Vorhofsmuskulatur ist lediglich insofern gegeben, als ebenfalls ein Mitoseanstieg zu verzeichnen ist. Dieser vollzieht sich jedoch ganz allmählich im Verlaufe mehrerer Tage und in auffälliger Weise erst in einem viel späteren Stadium nach zunächst sehr niedrigen Raten in den ersten beiden Tagen der beginnenden Septation; sowohl die Kammer- als auch die Vorhofswerte sind signifikant höher ($\frac{D}{s_D}$ 6. Tag

achtet wird. Auf einen schnellen und hohen Anstieg der Mitosen in den ersten Stunden folgt ein Abfall auf ein längere Zeit gehaltenes Niveau und erst danach ein weiteres Absinken auf einen Endwert um 0,4% einen Tag vor dem Schlupf. Bis zum 10. Bebrütungstag ist eine deutliche mitotische Differenz dieser beiden Herzabschnitte von 0,5—1% nachzuweisen; danach verlaufen beide Kurven gemeinsam. — Das Ventrikelseptum zeigt demgegenüber einen abweichenden und asynchronen Verlauf, als in den beiden ersten Tagen der Septation noch keine und in einem späteren Stadium erst eine recht mäßige Erhöhung der Mitosen nachzuweisen ist. Eine

Differenz zum Kammermyokard läßt sich bis zum 7. Tag der Bebrütung feststellen. Im parietalen Myokard der Ventrikel waren die prozentual höchsten Werte der Zellteilungs-

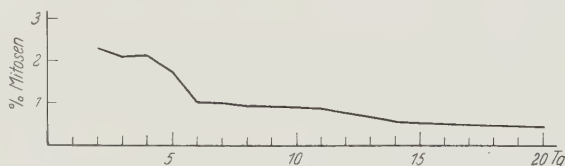


Abb. 7. Graphische Wiedergabe der Mitoschäufigkeit im Bulbus- und Ohrkanalendokard. Siehe auch Tabelle 7

figuren zu beobachten, in einem gewissen Abstand folgen Vorhöfe und das septale Myokard.

II. Bestimmung des Mitoseindex im Endokard

Für Mitosebestimmungen im Endokard wurden Zellen im lockeren Grundgewebe der Klappenanlagen im Bulbus- und Ohrkanalbereich bzw. in den definitiven Aorten-, Pulmonal- und Atrioventrikularklappen ausgezählt. Auch hier können zu Beginn der Entwicklung höhere Zellteilungszahlen um 2% nachgewiesen werden (Tabelle 7). Nach dem 4. Bebrütungstag folgt ein rascher Abfall der Werte bis auf 1% am 6. Tag. Dieses Niveau wird einige Tage beibehalten, um dann kontinuierlich weiter abzusinken auf 0,4% einen Tag vor dem Schlupf (Abb. 7). Damit läßt sich auch für das Endokard ein ähnlicher Verlauf feststellen, wie er für das Myokard bereits aufgezeigt wurde: nach verhältnismäßig hoher mitotischer Aktivität in den ersten Tagen sinkt diese zunächst auf ein

mehrere Tage gehaltenes niedrigeres Niveau und dann weiter auf einen für alle Herzgewebe gemeinsamen Endwert. Vom 4.—14. Bebrütungstag läßt sich ein Unterschied zum Kammermyokard statistisch einwandfrei sichern (Tabelle 8), während gegenüber der Mitosezahl des Vorhofmyokard (abgesehen vom 9. Tag und gegen Ende der pränatalen Entwicklungsperiode) keine weitgehenden Abweichungen feststellbar sind. Die höhere mitotische Aktivität des Kammermyokard gegenüber der des Endokard im Bulbus- und Ohrkanalbereich ist für eine Klärung der Herzfehlergenese bedeutsam und wurde in Abb. 8 graphisch wiedergegeben. Eine Zusammenstellung der entsprechenden statistischen

Tabelle 7. Mitosequoten im Endokard des Bulbus- und Ohrkanalbereiches

Bebrütungs- tag	Gezählte Zellkerne		Mitose %
	insgesamt	Mitosen	
2.	1370	32	2,3
3.	2460	52	2,1
4.	8770	188	2,15
5.	6000	106	1,75
6.	10230	104	1,0
7.	7880	81	1,0
8.	4160	40	0,95
9.	4750	45	0,95
11.	3720	33	0,9
14.	3330	18	0,55
20.	1340	6	0,45
	54040	705	—

Signifikanzwerte (Tabelle 8) erlaubt lediglich für den 2. und 3. Bebrütungstag keine eindeutige Sicherung der differentiellen Mitoseaktivität.

Abschließend wurde geprüft, ob die Mitoseaktivität in den einzelnen Endokardbezirken unterschiedlich ist. Wie in Tabelle 9 und graphisch in Abb. 9 dargestellt, liegt während der Frühentwicklung mit Ausnahme des 6. Bebrütungs-

Tabelle 8. *Statistische Signifikanzen des Mitoseunterschiedes von Ventrikulomyokard und Endokard im Bulbus- und Ohrkanalbereich*

Bebrütungstag	Mitosedifferenz	$\frac{D}{s_D}$
2.	0,35	0,72
3.	0,65	1,9
4.	1,0	5,0
5.	1,05	5,02
6.	1,0	6,95
7.	1,0	6,0
8.	0,95	4,2
9.	1,0	4,65
11.	0,5	3,1
14.	0,55	2,92

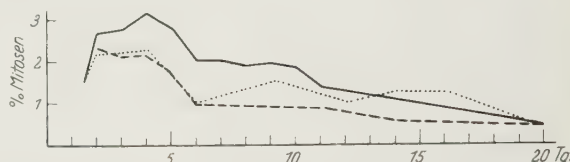


Abb. 8. Gegenüberstellung der Mitoseraten des Kammer- und Vorhofmyokard sowie des Endokard im Bulbus- und Ohrkanalbereich. ——— Kammermyokard; Vorhofmyokard; ——— Endokard

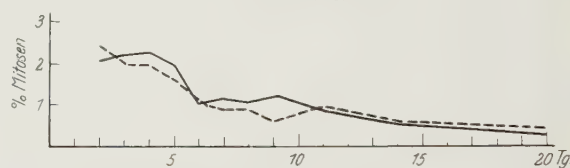


Abb. 9. Graphische Darstellung der Mitoseaktivität im Bulbus- und Ohrkanalendokard. ——— Bulbuswülste; ——— Ohrkanalkissen

Tabelle 9. *Mitoseprozent in den Endokardkissen des Bulbus- und des Ohrkanals*

Bebrütungstag	Bulbus		Ohrkanal	
	Zellzahl	Mitose %	Zellzahl	Mitose %
2.	200	2,0	1170	2,4
3.	1460	2,2	1000	2,0
4.	5670	2,25	3100	1,95
5.	3220	1,95	2780	1,6
6.	5260	1,0	4970	1,05
7.	4230	1,15	3650	0,9
8.	1770	1,05	2390	0,9
9.	2690	1,2	2060	0,6
11.	2000	0,85	1720	0,95
14.	2050	0,5	1280	0,65
20.	310	0,3	1030	0,45
	28860	—	25150	—

tages eine etwas höhere Mitosequote in den Bulbuswülsten vor, während nach dem 11. Tag beide Kurven im wesentlichen gemeinsam verlaufen. Die errechnete Wahrscheinlichkeit für eine solche Differenz bei Zusammenfassung der Werte vom 3.—9. Tag ist mit $\frac{D}{s_D} = 3,46$ signifikant. Sie rechtfertigt damit die Annahme, daß die Differenz tatsächlich Ausdruck einer im Bulbus endokard unterschiedlich vom Ohrkanalendokard wirkenden Einflußgröße ist.

III. Festlegung von Mindest-Zellzahlen zur statistischen Wahrscheinlichkeitsberechnung

Wir haben uns zunächst um eine möglichst genaue Bearbeitung unseres Untersuchungsgegenstandes bemüht. Es lag uns daher vor allem an der Gewinnung eines umfangreichen Materials. Die von uns ausgewerteten Zellzahlen liegen infolgedessen in den einzelnen Untersuchungsgruppen meist weit über den zu einer statistisch gesicherten Aussage erforderlichen. Da die Methodik des Vorgehens und Sicherung der Ergebnisse auch für weitere geplante Untersuchungen übernommen werden soll, haben wir jedoch im Interesse einer

Ökonomie der Untersuchung anschließend Mindestzellzahlen berechnet, deren Überschreitung keine wesentlich höhere Zuverlässigkeit der Ergebnisse mehr erbringt. Die Formelgrundlage dazu findet sich auf S. 107 im Abschnitt Statistik. In Abb. 7 sind in der letzten Kolumne als ein Beispiel die errechneten Zahlengrößen aufgeführt, die als Untersuchungsmaterial ausreichen würden, wenn der Aussage keine höhere Sicherheit als 99% zugrunde zu liegen braucht. Danach genügt es im allgemeinen, etwa 5000—6000 Zellen je Tag und Untersuchungsreihe zu zählen und auszuwerten. Es ist hierbei ohnehin zu berücksichtigen, daß die Einordnung über die Zeit fortlaufender Befunde in einen Kurvenzug, der etwa systematisch höher oder niedriger als die Testkurve liegt, eine über den Einzelbefund an einem bestimmten Tag weit hinausgehende Zuverlässigkeit der Aussage mit sich bringt.

Wir haben an unserem Material weiterhin geprüft, ob eine Verwendung der Kollerschen Tafeln für ähnliche Untersuchungen bei schnellerer Auswertung ohne Minderung der Aussagegenauigkeit möglich ist: hier können die jeweiligen Werte durch graphische Wiedergabe der üblicherweise tabellarisch angeordneten Signifikanzgrenzen — allerdings für 3σ -Äquivalente — einfach abgelesen werden. Wir haben mehrere Reihenversuche (Prüfen von Häufigkeitsziffern und Berechnung statistisch signifikanter Mindestzellzahlen) angestellt und — abgesehen von etwas höheren Mindestzellzahlen — gleiche Ergebnisse gewonnen. Da nur die eindeutige Über- bzw. Unterschreitung der geforderten Grenzwerte eine unseren Ansprüchen genügende Wahrscheinlichkeitsaussage erlaubt, ist die Ablese- Ungenauigkeit in einigen Kurvenbereichen unerheblich.

IV. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die von uns ermittelten Ergebnisse lassen sich in folgenden Hauptpunkten zusammenfassen:

1. Sowohl für das parietale Myokard von Kammer und Vorhof als auch für das Endokard im Bulbus- und Ohrkanalbereich ist in den ersten Tagen der Entwicklung nach raschem Anstieg am 2. Bebrütungstag eine relativ hohe Mitoseaktivität nachzuweisen. Nach Ausbildung der typischen Herzform am 4. Tag der Bebrütung sinkt der prozentuale Anteil der Mitosen zunächst auf ein mehrere Tage beibehaltenes, bedeutend niedrigeres Niveau, um dann weiterhin langsam bis zu einem Endwert von 0,4% am letzten Tag vor dem Schlupf abzufallen.

2. Für das Myokard des Kammerseptum setzt abweichend vom Verlauf der übrigen Herzmuskelabschnitte die mitotische Aktivität nach auffallend niedrigen Werten in den ersten Tagen relativ spät und „zögernd“ ein. Erst am 8. Bebrütungstag wird die Mitosequote des parietalen Kammermyokard erreicht. Nach diesem Zeitpunkt sind keine Unterschiede mehr festzustellen.

3. Die einzelnen Herzteile und -gewebe zeigen vor allem in der ersten Entwicklungsperiode erhebliche Wachstumsdifferenzen. Dies gilt besonders für die Myokardabschnitte: Eine Kammer-Vorhofdifferenz ist bis zum 10. Bebrütungstag nachweisbar; für das Kammerseptum werden zu Beginn der Septation Mitosewerte gefunden, die sowohl unter denen des Myokard der Vorhöfe als auch ganz besonders unter denen des parietalen Kammermyokard liegen.

4. Signifikante Mitosedifferenzen zwischen Bulbus- und Ohrkanalendokard werden während der ersten Entwicklungshälfte mit Ausnahme des 6. Tages vom 3.—9. Tag festgestellt.

5. Die mitotische Aktivität im Myokard der rechten und linken Herzkammer zeigt bei Zusammenfassung der Werte für jede Kammer vom 10.—16. Bebrütungstage ein innerhalb der 3σ -Grenze mathematisch-statistisch gesichertes Überwiegen der linkskammerigen Herzteile. Aus den entsprechenden Werten vom 4.—10. Bebrütungstag ist eine differente Wachstumsaktivität nicht zu sichern. Bei getrennter Auswertung der Mitosequoten für den rechten und linken Vorhof ist ein stärkeres Wachstum der rechtsseitigen Abschnitte für die Phase vom 4.—10. Tag signifikant; in Übereinstimmung mit den Kammerwerten überwiegt vom 10.—16. Bebrütungstag die Teilungshäufigkeit in den linksseitigen Teilen.

6. Unter Zugrundelegung einer Sicherheitsgrenze von 99% reicht im allgemeinen die Zählung von 5000—6000 Zellen je Tag und Untersuchungsreihe aus, um den statistischen Forderungen an eine ausreichende Berechnungsgrundlage zu entsprechen. Eine sichere Abgrenzung differenter Werte ist im allgemeinen erst bei einem Mitoseunterschied von 0,5% zu erreichen.

D. Diskussion

Untersuchungen über die mitotische Aktivität embryonaler und fetaler Hühnchenherzen sind bereits 1930 von OLIVO und SLAVICH zur Bestimmung der Wachstumsgröße angestellt worden. Die von diesen Autoren mitgeteilten Ergebnisse konnten jedoch nicht voll befriedigen; bei fehlender Berücksichtigung des unterschiedlichen Wachstums der einzelnen Herzgewebe bzw. Herzanteile wurde lediglich eine grobe Orientierung über das Wachstum des Gesamtorgans geboten. Die jetzt vorgelegten Resultate erlauben in Ergänzung der Angaben von KL. GOERTTLER (1956 b) über den enggesteckten Rahmen jener ersten Mitosezählungen hinaus eine präzise Aussage über die Wachstumsvorgänge des embryonalen Hühnchenherzens, soweit diese überhaupt durch Bestimmung der Mitosezahl als Indikator gesteigerter Stoffwechselvorgänge erfaßbar sind.

Der Umfang der Zellzählungen wurde groß gehalten, um die Ergebnisse auch bei Prüfung mittels strenger statistischer Kriterien mit uneingeschränktem Nachdruck vertreten zu können. Dies galt im besonderen für die noch nicht endgültig geklärte Frage nach der Bedeutung von Endokard und Myokard bei der orthischen und abartigen Entwicklung des Herzens. Eine Gegenüberstellung der Mitosewerte von Endokard und Kammermyokard ergibt bis gegen Ende der Bebrütungszeit eine signifikant höhere Wachstumsrate des *Myokard*. Die größere Wachstumsintensität des Myokard dürfte diesem Gewebe einen entscheidenden Einfluß auf die Gestaltung des Herzens sichern. Damit muß auch die von SHANER (1949) in Übereinstimmung mit PERNKOPF und WIRTINGER (1935) hervorgehobene entwicklungsmechanische Bedeutung des Endokard als wenig wahrscheinlich abgelehnt werden. Wir sind mit DOERR (1952 und 1955) der Ansicht, daß bei den Mißbildungen des arteriellen Herzens (Transpositionen und ihnen wesensmäßig nahestehende Herzfehler, wie Eisenmenger-Komplex mit „reitender“ Aorta und Taussig-Bing-Syndrom mit „reitender“ Pulmonalis) kein pathologischer Verlauf der endokardialen Septumleisten im Bulbotruncus, sondern vielmehr der mehr oder weniger gestörte Ablauf der Bulbuswanderung, d.h. die Arretierung

der „vektoriellen Bulbusdrehung“ ursächlich anzuschuldigen ist. Demnach ist primär eine *Myokardschädigung* im Bereich des arteriellen Herzschleifenschenkels anzunehmen. *Die abartige Septation stellt die Folge und nicht die Ursache dieser vorausgegangenen Entwicklungshemmung dar.*

In gleicher Weise sprechen auch die Ergebnisse von Durchströmungsversuchen an Glasmodellen normal und abnorm gestalteter embryonaler Herzanlagen (BREMER 1931/32, ROMHÁNYI 1953, KL. GOERTTLER 1955 und 1956a) gegen die angenommene entwicklungsmechanische Leistung der Endokardkissen. Nach diesen Untersuchungen ist eine fehlerhafte Ausbildung der ohnehin leicht verformbaren endokardialen Septen und Herzklappen bei der Entstehung von Mißbildungen des arteriellen Herzens als Folge einer andersartigen Blutstromrichtung anzunehmen; diese ist ihrerseits auf eine abartige Gestalt des Myoepikardmantels durch exogene oder endogene Schädigung (FOX und GOSS 1956, 1957 und 1958, GREGG 1941, SWAN 1951, RÜBSAAMEN 1955, SCHELLONG 1954, WILSON und WARKANY 1949, WEGENER 1961) zu beziehen. Es ist zu folgern — und dafür geben unsere Mitosebestimmungen eine eindeutige Bestätigung ab —, daß der ursächlich bestimmende Faktor in der Herzfehlergenese in einer wenn auch nicht ausschließlichen, so doch überwiegenden Schädigung des *Myokard* liegt.

Wir möchten die signifikante Differenz der Mitosequoten von Bulbus- und Ohrkanalendokardkissen mit Zurückhaltung interpretieren. Die ermittelten Unterschiede bieten unseres Erachtens keine hinreichende Erklärung für die erfahrungsgemäß häufigere (sichtbare) Bildungsstörung bzw. Deformation der bulbotrunkalen gegenüber den atrioventrikulären Septumleisten. Während im Vergleich mit der Mitosequote des Myokard die Werte für das gesamte Endokard erheblich niedriger liegen, sind die Differenzen zwischen den beiden Endokardbezirken am Bulbotrunkus und Ohrkanal doch recht gering. Eine durch Senkung der mitotischen Aktivität wirksame Entwicklungsstörung wird sehr viel wahrscheinlicher erst das Myokardgewebe schädigen und hierdurch indirekt die Endokardpolster umformen, ohne daß es zu direkter Beeinflussung der Zellteilungstätigkeit kommen muß. Damit ist die dem Endokard beigemessene Rolle bei der Entstehung angeborener Herzfehler in der Primärperiode der Herzentwicklung wenig wahrscheinlich und zumindest stark eingeschränkt; andererseits erlaubt die auffällig hohe mitotische Aktivität der *Myokardanteile* die Annahme einer überwiegenden und ursächlich bestimmenden Schädigung dieser wachstumsaktiveren Zellen.

Ein bedeutsamer Befund für den normalen Entwicklungsablauf und für die Entstehung von Defekten des myokardialen Kammerseptum läßt sich in den ersten Tagen der Septation erheben: bei auffallend niedrigen Mitoseraten wird eine nur geringe Wachstumsintensität im septalen Myokard festgestellt, die bedeutend unter der des parietalen Myokard liegt. Diese Beobachtung entspricht der von KL. GOERTTLER (1958) vertretenen Auffassung, nach der das Septum ventriculorum durch passive Einstülpung nach Krümmungen der Herzschleife entstanden zu denken ist. Eine Wachstumshemmung des myokardialen Septum mit nachfolgendem Defekt ist demzufolge *indirekt* über eine Alteration der seitlichen myokardialen Kammerwandabschnitte zu erklären.

Unsere Ergebnisse bekräftigen die Annahme, daß die entscheidende Ursache einer Herzmißbildung nicht in einer Schädigung des Endokard, sondern

vielmehr des *Myokard* zu suchen ist, dessen erhöhte Stoffwechselempfindlichkeit aus einer regen Teilungsaktivität erschließbar ist.

Die von uns durchgeführte Untersuchung stellt eine Modellanalyse dar und hat das Ziel, durch Bestimmung des Mitoseindex Anhaltspunkte über die Wachstumsgröße eines Organs und damit auch über dessen mutmaßliches Schädigungsmuster zu erhalten. Mit ihrer Hilfe läßt sich in recht einfacher Weise die „sensible Phase“ in der Entwicklung jedes Organs festlegen, in der auf Grund reger Wachstumsvorgänge eine erhöhte Schädigungsbereitschaft zu erwarten ist. Für das Hühnchenherz konnte diese kritische Periode von KL. GOERTTLER (1956 b) für den 2.—6. Bebrütungstag angegeben werden. — Eine experimentelle Bestätigung erfahren diese Ergebnisse durch die Reproduktion von Herzmißbildungen in eben dieser Entwicklungsphase (RÜBSAAMEN 1955, SCHELLONG 1954). WEGENER (1961) konnte eine ähnliche Phasenspezifität in entsprechenden Frühstadien bei der Ratte nachweisen. Die Methode erlaubt zusätzlich, die „sensible Phase“ eines bestimmten Organs im Hinblick auf besonders empfindliche Bezirke weiter aufzuschlüsseln. So läßt die höhere mitotische Aktivität der Kammern gegenüber den Vorhöfen für das Herz des sich entwickelnden Hühnchens den Schluß zu, daß sich eine wie auch immer beschaffene Alteration in erster Linie an diesem Herzabschnitt auswirken muß, und erst danach — etwa bei einer extrem starken Noxe — auch die Wachstumsvorgänge im Myokard der Vorhöfe hemmend beeinflussen wird. Andererseits wird wahrscheinlich eine Schädigung jenseits der Primärperiode *keine* differente Beeinträchtigung einzelner Herzgewebe und -bezirke nach sich ziehen.

Die von OLIVO und SLAVICH (1930) durchgeführten Mitosebestimmungen für das Hühnchenherz sind eingangs erwähnt worden. In Übereinstimmung mit jenen Mitosezählungen konnten auch wir annähernd gleich hohe Quoten in den ersten Entwicklungstagen ermitteln. Für den weiteren Verlauf ergaben sich jedoch Differenzen, denn die von uns erfaßten Mitosezahlen liegen an jedem der folgenden Tage um durchschnittlich 0,5% höher. Wir konnten außerdem nachweisen, daß der Rückgang der Mitoseaktivität mit steigendem Alter der Früchte nicht stetig und kontinuierlich erfolgt, und auch nicht nach mathematischen Gesetzmäßigkeiten, wie von den Verfassern angenommen wurde. Zumindest in der ersten Entwicklungshälfte ergibt sich für die einzelnen Myokardabschnitte ein mehrere Tage anhaltendes, signifikant gleichbleibend hohes Niveau oder sogar ein leichtes Ansteigen der Werte (Ventrikelmoyokard einschließlich Septum).

Nach unseren Untersuchungen beträgt der Mitoseindex für das Hühnchenherz während der „sensiblen Phase“ in den ersten Bebrütungstagen 2—3%. Verglichen mit Mitosequoten für das Neuralrohr und das Auge (DERRICK 1937) ist diese Mitoseaktivität relativ gering. So werden für das Telencephalon und das Sinnesepithel des Auges Anfangswerte von 8—9% angegeben, die in den folgenden Tagen auf 4—5% absinken. Demnach wären diese Organe oder Organbezirke vergleichsweise empfindlicher gegenüber etwaigen Stoffwechseleinflüssen. Es ist aber zu bedenken, daß die Stoffwechselgröße embryonaler Strukturen — damit auch deren „Schädigungsbereitschaft“ — nicht ausschließlich durch eine rein volumenmäßig sich auswirkende *Wachstumsleistung* bestimmt wird. Vielmehr muß eine für jedes Embryonalorgan verschieden hohe *Differenzierungsleistung* mit berücksichtigt werden. Wenn sich auch beide Stoff-

wechselkomponenten in gewisser Weise gegenseitig einschränken, darf keineswegs von einem Antagonismus gesprochen werden. Die Wachstumsverlangsamung geht wohl mit zunehmender Differenzierung einher, es ist aber daraus nicht der Schluß abzuleiten, daß die Differenzierung Ursache der Wachstumsverlangsamung sei (s. auch LINZBACH 1955). Mit dem Einsetzen der Funktion eines embryonalen Organs tritt eine weitere Stoffwechselleistung hinzu. Diese setzt am Hühnchenherzen schon frühzeitig mit dem Auftreten der ersten Muskelkontraktionen in der 35. Bebrütungsstunde ein und kann ebenso wenig wie die Differenzierungsleistung durch Bestimmung der Mitosequote erfaßt werden. Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen halten wir die Methode der Bestimmung der Mitosehöhe als *einen* Maßstab für die Beurteilung der Stoffwechselintensität schnell wachsender embryonaler Gewebe als angängig und brauchbar.

Es war das Ziel dieser Mitosezählungen, die Wachstumsrelationen der verschiedenen myokardialen und endokardialen Herzanteile quantitativ zu erfassen und einen Diskussionsbeitrag zu einigen noch nicht endgültig geklärten Fragen bei der Entstehung von Herzmißbildungen zu erstatten. Unsere Untersuchungen konnten die auch experimentell erfaßbare Abgrenzung einer teratogenetischen Determinationsperiode und damit einer gewissen Phasenspezifität bei der Entstehung einer Mißbildung (BLATTNER 1958, BÜCHNER 1958, RÜBSAAMEN 1955, SCHELLONG 1954, TÖNDURY 1956 und 1957) bestätigen. Sie zeigen den Weg auf, durch entsprechende Erfassung wachstumsaktiver Entwicklungsperioden in weiteren embryonalen Organanlagen zu einer zeitlichen Festlegung bestimmter Entwicklungsstörungen zu gelangen und ergänzen damit Zeittafeln, wie sie von HICKS (1953) und DOERR (1957) aufgestellt wurden. Eine sinngemäße Übertragung der am Hühnchenherzen gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen scheint uns im wesentlichen erlaubt, da die Herzentwicklung des Vogels weitgehend mit der des Menschen übereinstimmt, und ähnliche Wachstums- und Stoffwechselvorgänge zu vermuten sind. Zudem wurde durch Festsetzung der normalen Mitosequoten die Möglichkeit geschaffen, das Ausmaß einer Wachstumsverlangsamung und damit den Grad einer Schädigung im Vergleich mit jenen aufgestellten Normwerten *quantitativ* zu erfassen. Es wird die Aufgabe weiterer Untersuchungen sein, auch andere Organanlagen in ähnlicher Weise zu analysieren, um damit zu einer umfassenderen Interpretation ihrer jeweiligen Wachstumsstörungen zu gelangen.

Zusammenfassung

Basierend auf einem Untersuchungsgut von etwa 720 000 zeichnerisch erfaßten Zellen berichtet der Autor über die mitotische Aktivität des Hühnchenherzens während der gesamten Embryonal- und Fetalentwicklung. Die für die einzelnen Myokard- und Endokardabschnitte ermittelten Mitosequoten können als ein ungefähres Maß der Wachstumsintensität, damit auch der Schädigungsbereitschaft dieser Gewebsbezirke gelten und ermöglichen durch quantitative Analyse der Wachstumsvorgänge eine differenzierte Stellungnahme zu Fragen der formalen und zeitlichen Entstehung von Herzfehlern.

1. Im Gegensatz zu früheren Ansichten erscheint die Annahme einer entscheidenden entwicklungsmechanischen Bedeutung der bulbotrunkalen Endokardkissen bei der Entstehung von Entwicklungsstörungen des arteriellen Herzendes

wenig wahrscheinlich. Vielmehr läßt eine Reihe von Einzelbefunden, besonders die signifikant höhere Anzahl der Kernteilungsfiguren im Myokardgewebe gegenüber den im Endokard beobachteten Mitoseraten während der Primärperiode den Schluß zu, daß der *ursächlich bestimmende Faktor in der Herzfehlergenese in einer, wenn auch nicht ausschließlichen, so doch überwiegenden Schädigung der myokardialen Herzanteile zu suchen ist.*

2. Defekte des myokardialen Septum ventriculorum sind *indirekt* über eine Wachstumsstörung der seitlichen Kammerwandabschnitte entstanden zu denken. In dieser Richtung wird jedenfalls die in den ersten Tagen der Septation auffallend geringe mitotische Aktivität im Septummyokard bei erheblich höherer Wachstumsintensität der parietalen Kammerbezirke zu deuten sein. Damit kann gleichzeitig der von KL. GOERTTLER (1958) vermutete Entstehungsmechanismus des Ventrikelseptum als passive lumenwärtige Einstülpung eines Schlauchteiles durch Krümmungen der Herzscheife direkt bewiesen werden.

3. Die bisher nur experimentell erfolgte Festlegung einer „sensiblen Phase“ der Herzentwicklung mit erhöhter Schädigungsbereitschaft in den ersten Bebrütungstagen konnte durch Auswertung der Mitosehäufigkeit substantiiert werden: hohe Mitosequoten in dieser Primärperiode sprechen für eine besondere Empfindlichkeit und lassen uns die Entstehung von Entwicklungsstörungen verständlich werden. In erster Linie dürfte das Kammermyokard betroffen sein, weniger stark und häufig dagegen das Vorhofmyokard und die Endokardwülste im Bulbus und Ohrkanal.

4. Jenseits der „sensiblen Phase“ der Herzentwicklung ist eine differente Beeinträchtigung einzelner Herzteile und -gewebe weniger wahrscheinlich.

5. Mit der Festsetzung des Mitoseindex im Normbereich wurde exemplarisch die Möglichkeit geschaffen, das Ausmaß einer Wachstumsverlangsamung und damit den Grad einer Schädigung durch Vergleich mit den als Normwerten ermittelten Quoten quantitativ zu erfassen. Mit gleicher Methodik ist es möglich, die Empfindlichkeit aller Organe und Gewebe des Organismus nach Maßgabe ihrer mitotischen Aktivität, d.h. für *ein* Kriterium der Wachstumsaktivität, numerisch zu erfassen, die dann als Grundlage für anzustellende Schädigungsversuche dienen kann. Fernziel dieser und ähnlicher Untersuchungen muß die Aufstellung einer exakten Zeittafel mit Einarbeitung der relativen Empfindlichkeiten einzelner Organe bzw. Organteile und Gewebe sein.

Literatur

- BLATTNER, R. J.: Teratogenic changes in early embryos following administration of antitumor agent (azaserine). Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **97**, 560—564 (1958).
 BREMER, J. L.: The presence and influence of two spiral streams in the heart of the chick embryo. Amer. J. Anat. **49**, 409—440 (1931/32).
 BÜCHNER, FR.: Die pathogenetische Bedeutung der Oxydationshemmung. Schweiz. med. Wschr. **1958**, 73—77.
 DERRICK, E.: An analysis of the early development of the chick by means of the mitotic index. J. Morph. **61**, 257—284 (1937).
 DOERR, W.: Über ein formales Prinzip der Koppelung von Entwicklungsstörungen der venösen und arteriellen Kammerostien. Z. Kreisl.-Forsch. **41**, 269—284 (1952).
 — Die formale Entstehung der wichtigsten Mißbildungen des arteriellen Herzendes. Beitr. path. Anat. **115**, 1—32 (1955).

- DOERR, W.: Kyematopathien und perinatale Krankheiten. *Ärzt. Wschr.* **33**, 721—731 (1957).
- V. BECKER u. KL. GOERTTLER: Über den Schädigungsstoffwechsel. Paradigmatische morphologische Äquivalente. *Dtsch. med. Wschr.* **1959**, 317—320.
- FOX, M. H., and CH. M. GOSS: Experimental production of a syndrom of congenital cardiovascular defects in rats. *Anat. Rec.* **124**, 189—208 (1956).
- Experimentally produced malformations of the heart and great vessels in rat fetuses. Atrial and caval abnormalities. *Anat. Rec.* **129**, 309—332 (1959).
- Experimentally produced malformations of the heart and great vessels in rat fetuses. Transposition complexes and aortic arch abnormalities. *Amer. J. Anat.* **102**, 65—92 (1958).
- GOERTTLER, KL.: Über die Blutstromwirkung als Gestaltungsfaktor für die Entwicklung des Herzens. *Beitr. path. Anat.* **155**, 33—55 (1955).
- Hämodynamische Untersuchungen über die Entstehung der Mißbildungen des arteriellen Herzens. *Virchows Arch. path. Anat.* **328**, 391—420 (1956a).
- Die Stoffwechseltopographie des embryonalen Hühnchenherzens und ihre Bedeutung für die Entstehung angeborener Herzfehler. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **40**, 181 (1956b).
- Normale und pathologische Entwicklung des menschlichen Herzens. In: *Zwänglose Abhandlungen aus dem Gebiete der normalen und pathologischen Anatomie*. Stuttgart: Georg Thieme 1958.
- GREGG, N. M.: Congenital cataract following german measles in the mother. *Trans. ophthal. Soc. Aust.* **3**, 35—46 (1941).
- HAMBURGER, V.: The mitotic patterns in the spinal cord of the chick embryo and their relation to histogenetic processes. *J. comp. Neurol.* **88**, 221—283 (1948).
- HICKS, S. P.: Developmental malformations produced by radiation. A timetable of their development. *Amer. J. Roentgenol.* **69**, 272—293 (1953).
- KOLLER, S.: *Graphische Tafeln zur Bestimmung statistischer Zahlen*. Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff 1953.
- LINZBACH, A. J.: Quantitative Biologie und Morphologie des Wachstums einschließlich Hypertrophie und Riesenzellen. In: *Handbuch der allgemeinen Pathologie*. Bd. 6/I: Entwicklung, Wachstum, S. 200. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- MINOT, CH. S.: The problem of age, growth and death. New York City: Putman 1908. *Sci. Monthly* **71** (1907).
- OLIVO, O. M., u. E. SLAVICH: Ricerche sulla velocità dell'accrescimento delle cellule e degli organi. *Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org.* **121**, 96—110 (1930).
- PATTEN, B. M.: The early embryology of the chick, 3th edit. 1929. Philadelphia: Blakiston Company 1948.
- , and R. PHILPOTT: The shrinkage of embryos in processes preparatory to sectioning. *Anat. Rec.* **20**, 393—413 (1920/21).
- PERNKOPF, E., u. W. WIRTINGER: Das Wesen der Transpositionen im Gebiete des Herzens, ein Versuch der Erklärung auf entwicklungsgeschichtlicher Grundlage. *Virchows Arch. path. Anat.* **295**, 143—175 (1935).
- ROMEIS, B.: *Mikroskopische Technik*. München: Leibnitz 1948.
- ROMHÁNYI, G.: Über die Rolle hämodynamischer Faktoren im normalen und pathologischen Entwicklungsvorgang des Herzens. *Acta morph. Acad. Sci. hung.* **2**, 297—312 (1952).
- RÜBSAAMEN, H.: Mißbildungen durch O₂-Mangel im Experiment und in der menschlichen Pathologie. *Naturwissenschaften* **42**, 319—325 (1955).
- SCHELLONG, G.: Herz- und Gefäßmißbildungen beim Hühnchen durch O₂-Mangel. *Beitr. path. Anat.* **114**, 212—243 (1954).
- SCHENK, R.: Über die Beeinflussung der Entwicklung durch weibliche Sexualhormone. *Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org.* **144**, 448—477 (1950).
- SCHULTZ, A. F.: The mitotic index of the chick. *Proc. Oklahoma Acad. Sci.* **2**, 45—48 (1922).
- SHANER, R. F.: Malformation of the atrio-ventricular endocardial cushions of the embryo pig, and its relations to defects of the conus and truncus arteriosus. *Amer. J. Anat.* **84**, 431—456 (1949).
- SWAN, C.: Rubella and congenital defects (congenital malformations associated with rubella and other virus infections). *Modern practice in infectious fevers*, vol. 2, p. 528—552. London: Butterworth & Co. 1951.

- TÖNDURY, G.: Entwicklungsstörungen durch chemische Faktoren und Viren. *Naturwissenschaften* **42**, 312—319 (1955).
- Die kritischen Phasen in der Embryonalentwicklung und ihre Störung durch chemische Faktoren und Viren. *Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich* **101**, 93—138 (1956).
- WEBER, E.: *Grundriß der biologischen Statistik*, 3. Aufl. Jena: Gustav Fischer 1957.
- WEGENER, K.: Über die experimentelle Erzeugung von Herzmißbildungen durch Trypanblau. *Arch. Kreisl.-Forsch.* **34**, 99—144 (1961).
- WILSON, J. G., and J. WARKANY: Aortic-arch and cardiac anomalies in the offspring of vitamin A deficient rats. *Amer. J. Anat.* **85**, 113—156 (1949).

Dr. med. DIETER GROHMANN,
Pathologisches Institut der Universität Kiel
Hospitalstraße 42

Comitato Nazionale per l'Energia nucleare. Divisione di Biologia e Protezione sanitaria.
Gruppo di ricerca per l'Embriologia. Frascati (Roma), Italia

SUL COMPORTAMENTO DEL POLMONE EMBRIONALE DI POLLO COLTIVATO IN VITRO

Di

TOMMASO ALESCIO*

Con 18 figure nel testo

(In redazione il 18 aprile 1961)

Introduzione

La tecnica della cultura organotipica *in vitro* è stata impiegata da vari ricercatori nello studio della differenziazione dell'intestino primitivo e dell'apparecchio respiratorio del pollo.

Gli stadi più precoci furono utilizzati da DE JONG e DE HAAN (1943) che coltivarono l'intero complesso costituito dall'esofago, stomaco e trachea, espianato al 4°-5° giorno di incubazione, secondo una loro tecnica comportante la perfusione continua dell'abbozzo. Per quanto riguarda il polmone, si osserva la ramificazione dicotomica dei bronchi che subiscono, all'estremo dei loro rami di divisione, una dilatazione cistica, mentre la struttura istologica dell'abbozzo si perfeziona e si differenziano placche cartilaginee.

In culture organotipiche dello stesso complesso esofago-stomaco-trachea KEUNING (1948) studiò la differenziazione di cellule nervose appartenenti al sistema nervoso autonomo. La comparsa di tali cellule, che presentano prolungamenti e neurofibrille colorabili col metodo di BODIAN, sarebbe indipendente dalla conservazione o dall'esclusione, nell'espianto, del ganglio del vago: per questa ragione l'autore ritiene che avvenga una vera differenziazione di alcune cellule mesenchimali in cellule nervose.

Le osservazioni di LOFFREDO SAMPAOLO e SAMPAOLO (1956a, b; 1957a, b; 1958) illustrano il comportamento di abbozzi prelevati da embrioni in stadi più avanzati, dal 7° fino all'11° giorno di incubazione e coltivati in alcuni casi insieme con il cuore ed i grossi vasi, in altri casi isolatamente. Gli autori descrissero le modificazioni morfologiche subite dall'espianto, che sarebbero essenzialmente in relazione con le sue dimensioni, in quanto esso tende, quando sia di piccola mole, ad appallottolarsi sul coagulo, mentre si appiattisce quando è di grandezza maggiore. La differenziazione istologica dell'epitelio e del mesenchima continua; le cellule epiteliali si mostrano capaci di svolgere attività morfogenetiche le cui principali espressioni morfologiche sono la moltiplicazione cellulare, la secrezione e lo sticotropismo. Il mesenchima dal canto suo si differenzia, in buon parallelismo con quanto avviene nei controlli non coltivati, producendo gli anelli cartilaginei peritracheali e le cellule muscolari lisce che formano la muscolatura bronchiale. In un lavoro più recente LOFFREDO SAMPAOLO e SAMPAOLO (1961) hanno esteso le ricerche a stadi più precoci, a cominciare dal 4° giorno d'incubazione, e si sono serviti anche della microcinematografia.

* Ringrazio il Prof. E. BORGHESI, che ha seguito l'esecuzione della presente ricerca.

Le ricerche della RUDNICK (1933) si valsero invece della tecnica dell'innesto corioallantoideo di parti di embrioni di pollo prelevati dallo stadio di 12 ore fino a quello di 5 giorni di incubazione. Gli stadi più precoci, vale a dire l'area blastodermica destinata a sviluppare l'apparecchio respiratorio e la regione ventrale di embrioni allo stadio di 14-20 somiti, danno origine ad un tubo respiratorio regionalmente differenziato in direzione anteroposteriore. Un grado più avanzato di differenziazione può essere ottenuto da innesti di stadi più avanzati: gemme polmonari appena abbozzate possono evolvere solo occasionalmente, fino ad originare un vero e proprio albero bronchiale. Lo stesso risultato è ottenuto con maggiore frequenza e, rispettivamente, con costanza, quando si espuntano gli abbozzi polmonari allo stadio di 4 giorni di incubazione, formati da gemme polmonari più lunghe ma non ancora ramificate, e di 5 giorni di incubazione, quando le prime gemme secondarie sono già formate. I dettagli di struttura dell'albero bronchiale sono più esattamente riprodotti negli innesti eseguiti a quest'ultimo stadio. I processi di gemmazione e di ramificazione dell'albero bronchiale si interrompono se il mesenchima polmonare viene meccanicamente allontanato prima di eseguire l'innesto.

Notizie bibliografiche sull'embriologia del polmone degli uccelli

Lo sviluppo dell'apparecchio respiratorio del pollo è stato oggetto di studio da parte di SELENKA (1866), WEBER e BUVIGNIER (1903), ROSLER (1911), WEBER (1928), ma soprattutto alle dettagliate ricerche di LOCY e LARSELL (1916) si devono le più approfondite conoscenze in proposito; BARGMANN (1936) ne illustrò in particolare l'istogenesi.

L'intero apparecchio respiratorio prende origine dalla faringe come una doccia che si evagina dalla parete ventrale per rinchiuersi ben presto a tubo, costituendo l'abbozzo iniziale della trachea. Dalla estremità craniale di essa si formerà la laringe, priva, come è noto, di organo vocale, che negli uccelli è rappresentato dalla siringe, il cui sviluppo *in vitro* è stato oggetto delle ricerche di ET. e EM. WOLFF (1952) e EM. WOLFF (1957 a, b, c).

All'estremità caudale della trachea si formano due gemme rotondeggianti che costituiscono l'abbozzo dei bronchi primari. A questo stadio l'apparecchio respiratorio risulta dunque costituito da un tubo endodermico bifido all'estremo caudale e rivestito da mesenchima. I bronchi primari si accrescono rapidamente in lunghezza e diviene possibile distinguervi due porzioni: una craniale destinata a rimanere estrapolmonare, e una caudale, intrapolmonare, che prende il nome di mesobronco. Da quest'ultimo prenderanno origine tutte le formazioni costituenti l'organo polmonare, grazie ad un processo di ramificazioni successive.

Dal terzo medio del mesobronco stesso si formano in tal modo i bronchi di secondo ordine: tenendo conto della loro epoca di comparsa, del punto di origine dal bronco primario, della direzione di crescita e della disposizione assunta, essi vengono divisi in quattro gruppi indicati col nome di entobronchi, ectobronchi, dorsobronchi, laterobronchi (LILLIE-HAMILTON 1952). Dall'estremità caudale dei bronchi primari si originano inoltre i sacchi aeriferi addominali.

La suddivisione dei bronchi secondari dà origine a due diversi tipi di formazioni. Il primo è rappresentato dai rami bronchiali di terzo ordine, chiamati parabronchi, i quali si accrescono in forma di sottili condotti epiteliali di calibro uniforme, si dirigono l'uno verso l'altro e finalmente si anastomizzano, trasformando così l'albero bronchiale, fino a questo momento terminante con fondi ciechi, in un complesso di circuiti epiteliali chiusi, caratteristica peculiare del polmone degli uccelli. Da tali circuiti prenderanno finalmente origine i capillari aeriferi, che costituiscono la porzione respiratoria in senso stretto.

Il secondo tipo di formazioni che si sviluppano dai bronchi secondari, sempre per mezzo del medesimo processo di gemmazione, è costituito dai sacchi aeriferi, in numero di cinque, tutti pari salvo l'interclavicolare (ROMANOFF 1960). Di essi soltanto i sacchi aeriferi addominali prendono diretta origine, come si è detto, dai mesobronchi. Tutti gli abbozzi dei sacchi

aeriferi si rendono sporgenti dalla superficie dell'abbozzo polmonare a partire dal nono giorno di incubazione (LARSELL 1914/15).

I sacchi aeriferi emettono a loro volta i bronchi ricorrenti, i quali si dirigono verso l'interno del polmone per riunirsi all'albero bronchiale, richiudendo in tal modo anche a questo livello il circuito che sarà percorso dall'aria durante la respirazione: dai bronchi primari ai sacchi aeriferi e quindi di nuovo ai primi attraverso i bronchi ricorrenti.

Materiali e metodi

Nel complesso di ricerche che in questo laboratorio si vanno svolgendo allo scopo di studiare l'azione delle radiazioni ionizzanti sugli organi che si sviluppano isolatamente *in vitro*, mi si è presentata l'opportunità di studiare se fosse possibile ottenere un buon sviluppo, in condizioni di cultura, del polmone di pollo. I risultati sono stati favorevoli e vengono qui esposti in forma completa dopo la pubblicazione, già avvenuta, di alcuni dati preliminari (ALESCIO 1959, 1960a).

Sono stati impiegati embrioni di pollo della razza New Hampshire, di età compresa fra in 4 e i 5 giorni di incubazione.

Gli abbozzi polmonari sono stati coltivati, alcune volte completamente isolati, altre volte insieme con l'esofago, in vetro da orologio secondo la tecnica di FELL e ROBISON (1929) oppure in goccia pendente su vetrino coprioggetto.

Il terreno usato è costituito da parti uguali di plasma di pollo maschio adulto e da estratto di embrioni di pollo di 9 giorni di incubazione.

Le culture vennero trapiantate ogni 48 ore su terreno fresco.

Il numero di culture eseguite per ciascuno stadio di sviluppo e la loro durata sono riportati nella tabella seguente.

Tabella

Età dell'espianto in giorni d'incubazione	Numero di culture fissate dopo giorni					Totale
	1	2	3	4	5	
4 \pm 6 ore	0	3	2	5	11	21
5 \pm 6 ore	4	12	18	18	12	64
Totale	4	15	20	23	23	85

Gli abbozzi coltivati, oltre ad altri non usati per culture ma prelevati a scopo di controllo da embrioni sviluppatisi in condizioni naturali dal 4° al 10° giorno di incubazione, sono stati fissati in Zenker o in Susa, inclusi in paraffina e sezionati in serie allo spessore di 6 μ . Le sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina oppure con il metodo Azan.

Alcuni abbozzi coltivati in goccia pendente, previa fissazione in Susa, sono stati colorati *in toto* col carmallume.

Per quanto riguarda la capacità dell'abbozzo di polmone espantato ad adattarsi a tecniche diverse di cultura, ho potuto constatare che ha dimostrato una netta preferenza per il metodo di FELL e ROBISON (1929), cioè della cultura alla superficie di un coagulo in vetro da orologio. Espantato infatti in queste condizioni, l'abbozzo ha proseguito regolarmente la differenziazione per un periodo di 5-6 giorni; mentre quando è stato coltivato, pur sullo stesso terreno nutritizio, su vetrino coprioggetto rovesciato su un portaoggetti a concavità centrale, cioè con la tecnica detta comunemente della goccia pendente, non è sopravvissuto in buone condizioni per più di due giorni; né i trapianti eventualmente eseguiti prima dello scadere di questo termine giovano in maniera sensibile a prolungare la sopravvivenza e la differenziazione.

Sembra quindi che abbiano importanza anche le condizioni dell'atmosfera messa a disposizione della cultura, come la quantità di aria, il grado di umidità, e la quantità di terreno, molto superiore nella tecnica del vetro da orologio, in relazione forse alla concentrazione dei prodotti catabolici della cultura.

Osservazioni sulle culture intere

Durante il 4° giorno di incubazione l'abbozzo dell'apparecchio respiratorio ha la forma di un Y, il cui tronco rappresenta la trachea e i due rami gli abbozzi dei due polmoni: posteriormente aderisce all'esofago, da cui può essere tuttavia separato senza grande difficoltà. Occorre però notare che tale separazione implica la necessità di creare un'ampia superficie di taglio, dalla quale generalmente avviene una migrazione cellulare che non è favorevole al buon proseguimento di una cultura organotipica.

L'abbozzo è costituito da una cospicua massa mesenchimale, entro cui, quando non risulti troppo opaca, si possono osservare i tubi corrispondenti alla parte epiteliale della trachea e dei bronchi primari.

In questo stadio infatti la parte epiteliale della trachea, formatasi come una derivazione dell'epitelio entodermico della faringe e rivestita da un manicotto mesenchimale, ha già dato origine ai due bronchi primari, il cui tratto più craniale è destinato a rimanere estrapolmonare, mentre la sua continuazione, che prende il nome di mesobronco, è destinata a dare origine alla porzione intrapolmonare del bronco primario stesso ed a tutte quante le vie aerifere del polmone, compresa la vera e propria porzione respiratoria, grazie ad un processo continuo di ramificazione.

Le prime fasi di questo processo proseguono, entro certi limiti, nelle condizioni di isolamento realizzate mediante la cultura *in vitro*.

Dopo che l'abbozzo è stato posto in cultura, il mesenchima polmonare si rende progressivamente più diafano, presumibilmente a causa di imbibizione di acqua e di conseguente allontanamento delle sue cellule, il che facilita l'osservazione del comportamento dei tubuli epiteliali e permette di seguire più facilmente il progresso della ramificazione. Tale diafanizzazione non è peraltro totale e consente l'osservazione, in condizioni di particolare perspicuità, di un fatto che avviene anche normalmente, come dimostra lo studio delle sezioni dei controlli non coltivati, cioè di un comportamento particolare del mesenchima nelle immediate vicinanze dell'epitelio. Nella Fig. 1, e a maggiore ingrandimento nella Fig. 2, si osserva, in una cultura montata *in toto*, un addensamento del mesenchima in prossimità di una gemma laterale del mesobronco. Tale addensamento, caratteristico e costante, indica l'esistenza di una relazione reciproca fra struttura del mesenchima e processo di ramificazione del bronco, che probabilmente è fondata sull'esistenza di uno di quei processi di induzione esercitati dal mesenchima sulla ramificazione epiteliale, sui quali ha richiamato l'attenzione il BORCHESE (1950) a proposito delle ghiandole salivari del topo, e che sono stati poi studiati, con tecnica più approfondita, in vari organi, fra cui anche il polmone pure del topo, dal GROBSTEIN (1955).

Si deve però aggiungere che le culture iniziate ad uno stadio così precoce, quale è quello sopra descritto, raramente danno origine ad una ricca ramificazione bronchiale: essa rimane generalmente limitata all'iniziale comparsa di piccoli rami collaterali che non progrediscono ulteriormente, mentre gli estremi dei bronchi primari tendono a trasformarsi, come si vede nella già citata Fig. 1, in saccocce tondeggianti, e gli abbozzi dei sacchi aeriferi addominali, che possono essere già visibili al momento dell'espianto, scompaiono.

Più redditizie si sono dimostrate, agli effetti di un prolungarsi abbastanza lungo della cultura accompagnato dal progredire della ramificazione dei bronchi



Fig. 1. Polmone espantato al 4° giorno di incubazione e coltivato per 3 giorni. Bronco primario destro. Si osserva un addensamento del mesenchima attorno alla gemma iniziale di un bronco secondario. Il sacco aerifero addominale è scomparso e la terminazione del bronco principale si è dilatata a sacco. Cultura colorata in toto col carmallume. $\times 64$

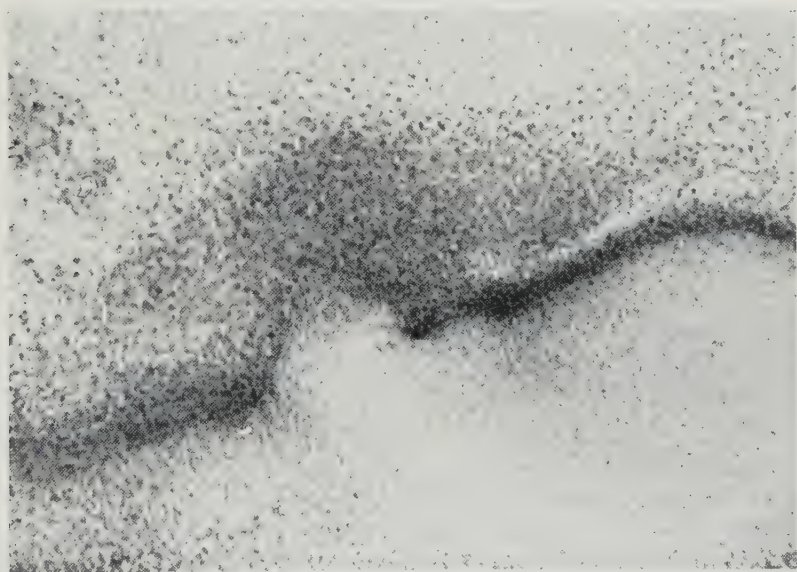


Fig. 2. Particolare a più forte ingrandimento del preparato riprodotto nella figura precedente, per dimostrare meglio l'addensamento mesenchimale. $\times 120$

e della differenziazione strutturale, le culture iniziate da stadi più avanzati, quali si osservano generalmente al 5° giorno di incubazione, e molto raramente al 4°. in cui al momento dell'espanto sia già comparsa almeno la prima gemma

secondaria. Questa si forma pressappoco al confine fra il terzo craniale ed il terzo medio di ciascun bronco primario.

Si può allora seguire direttamente sull'abbozzo vivente l'accrescersi della gemma preesistente e la comparsa successiva di nuove gemme bronchiali. Esse si originano dalla parete del bronco primario in maniera tipicamente monopodica, con l'aspetto di piccoli sollevamenti epiteliali, attorno ai quali l'addensamento mesenchimale, a mano a mano che essi si allungano, acquista l'aspetto di uno

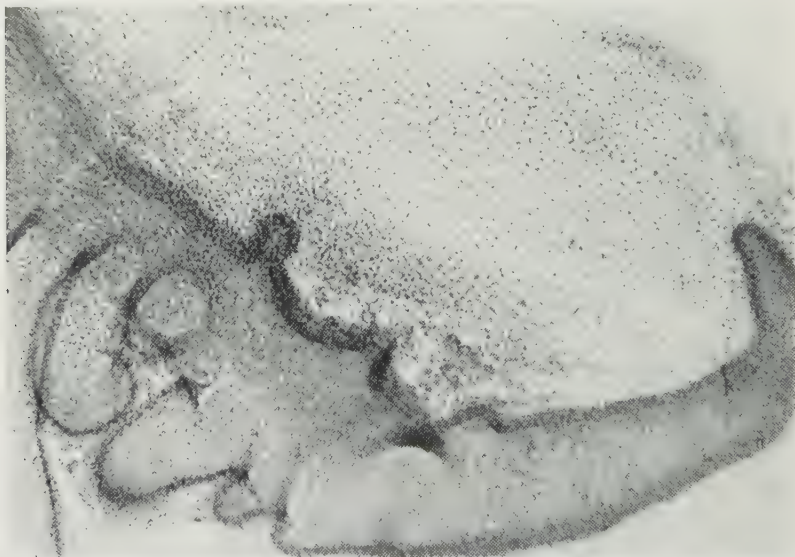


Fig. 3. Polmone espantato al 5° giorno di incubazione e coltivato per 2 giorni. Bronco primario destro. Si osservano alcune gemme laterali in corso di sviluppo e una gemma mediale al suo inizio. Cultura colorata in toto col carmallume. $\times 64$

strato più regolare e continuo che riveste il tubo epiteliale. I sollevamenti così formati si accrescono rapidamente trasformandosi in bozze rotondeggianti la cui base d'impianto si viene gradatamente restringendo: come risultato di questi fenomeni, crescita in lunghezza e restringimento alla base, la gemma neoformata acquista una forma nettamente clavata.

Le gemme compaiono in ordine cranio-caudale, cominciando da quelle situate caudalmente alla gemma già esistente all'inizio della cultura. Tutte sono fornite di cavità fino dall'inizio della loro formazione: non si tratta mai di gemme piene che si canalizzano successivamente.

Queste prime fasi possono essere seguite grazie all'osservazione diretta della cultura vivente, e sono apprezzabili con chiarezza anche in espianti fissati e colorati *in toto*, almeno per i primi due giorni di cultura. La Fig. 3 dimostra le gemme laterali di un mesobronco destro e l'inizio della formazione di una gemma mediale in un abbozzo di polmone espantato al 5° giorno e fissato dopo due giorni di coltivazione. Nella Fig. 4, che riproduce l'altro mesobronco, è particolarmente evidente la forma clavata di un bronco secondario. In ambedue il sacco aerifero addominale si è ben conservato e si è accresciuto in lunghezza.

I fenomeni descritti si svolgono durante i primi due giorni di cultura in abbozzi espantati al 5° giorno di incubazione.

Nelle successive fasi di sviluppo, dal terzo giorno di cultura in poi, avviene la comparsa degli abbozzi dei parabronchi o rami di terzo ordine. Si tratta di un processo consistente nell'evaginazione dall'epitelio, a dito di guanto, di gemme cave di calibro molto ristretto, che si allungano nel mesenchima senza assumere la forma clavata caratteristica delle gemme secondarie.

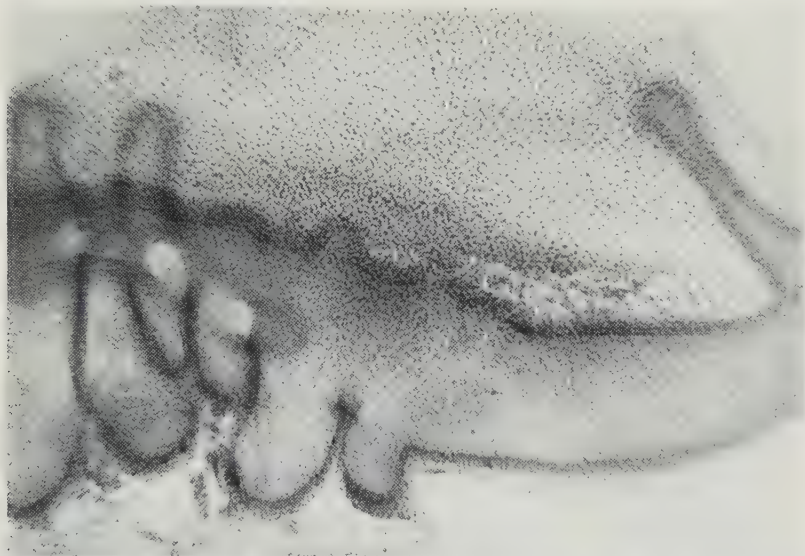


Fig. 4. Polmone espantato al 5° giorno di incubazione e coltivato per 2 giorni. Bronco primario sinistro. Una gemma in basso a sinistra na forma clavata. Cultura colorata in toto col carmallume.
× 64

Tuttavia la loro sovrapposizione ed il loro piccolo calibro rende difficile l'osservazione diretta sulla cultura vivente della formazione dei parabronchi, che possono quindi essere adeguatamente studiati solo sulle sezioni.

Tutto quanto è detto sopra si riferisce a polmoni espantati interi. Un solo bronco primario reciso dalla trachea e coltivato isolato, conserva la proprietà di produrre in scarso numero alcune gemme le cui caratteristiche istologiche sono simili alla norma; il risultato cui si giunge è però lontano, dal punto di vista morfologico, dal ripetere l'aspetto di un abbozzo polmonare normale, trattandosi per lo più di un tubulo aggomitolato e munito di diverticoli irregolarmente disposti.

Osservazioni sulla struttura istologica

Gli aspetti istologici della differenziazione polmonare *in vitro* risultano molto simili ai quadri offerti da abbozzi sviluppatisi in condizioni naturali.

Al momento dell'espianto, tanto la trachea quanto i bronchi primari hanno un epitelio cilindrico pseudostratificato molto alto; i nuclei tendono ad occupare una posizione vicina al lume, lasciando libero il citoplasma in profondità. Le mitosi, molto numerose, si osservano nella parte dell'epitelio in prossimità del lume. Una sottile membrana basale separa l'epitelio dal mesenchima le cui

cellule, in prossimità dell'epitelio stesso, risultano fittamente addensate in modo da costituire uno spesso manicotto continuo che accompagna e riveste le strutture epiteliali e si continua a sua volta perifericamente con un mesenchima a cellule meno fitte. Si può dunque applicare al mesenchima embrionale del polmone del pollo la distinzione in mesenchima peritubulare denso e mesenchima intertubulare più rarefatto illustrata da SCROCCA (1942) e da DANESINO (1946) nel polmone embrionale dell'uomo e di alcuni mammiferi; il mesenchima peritubulare addensato è presumibilmente destinato a dare origine alle tonache connettivali dei bronchi.

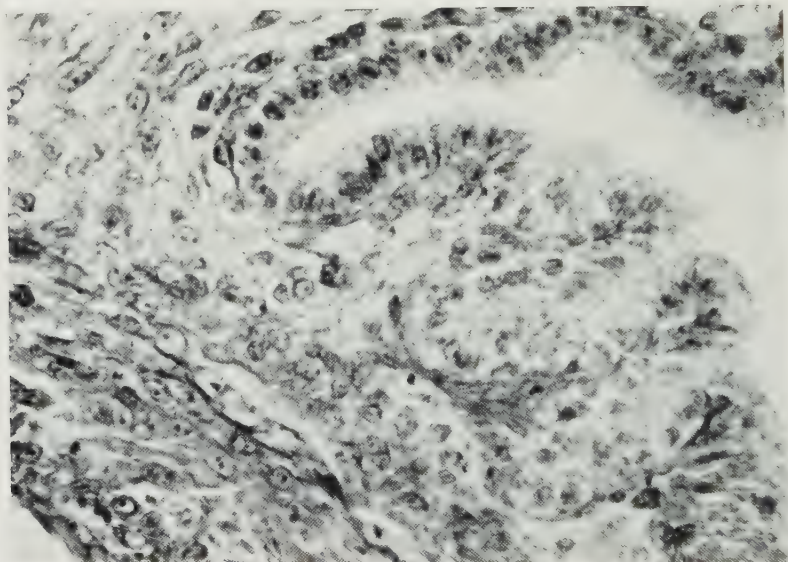


Fig. 5. Polmone espianato a 5 giorni di incubazione e coltivato per 5 giorni. Pieghe della mucosa bronchiale formatesi in cultura. Susa. Azan. $\times 590$

Le gemme secondarie si presentano come evaginazioni epiteliali attorno alle quali appare conservato l'addensamento mesenchimale sopra descritto. L'epitelio della gemma mantiene inizialmente la struttura pseudostratificata dell'epitelio di origine, ma nel suo complesso, specialmente al colletto della gemma stessa, appare più basso.

Durante il periodo della cultura l'epitelio della trachea e dei bronchi subisce processi morfologici e citologici di differenziazione molto simili a quelli che si osservano nello sviluppo in condizioni naturali.

L'epitelio della trachea e dei bronchi primari, accompagnato da un asse del mesenchima, si solleva in pieghe che sporgono nel lume, come quelle riprodotte nella Fig. 5, del tutto simili a quelle che si osservano nei controlli non coltivati di età corrispondente. Alla superficie dell'epitelio, dove esso guarda verso il lume, compare in alcuni tratti un materiale omogeneo, colorabile in rosa con l'eosina, in azzurro con l'Azan, che corrisponde alle immagini comunemente interpretate come secrezione vescicolare. Un reperto di questo tipo è riprodotto nella Fig. 6: il confronto con un polmone non coltivato, ma sviluppatosi natural-

mente per un periodo di tempo pressappoco uguale (Fig. 7) dimostra che si tratta di un fatto che si produce anche nella normale embriogenesi.

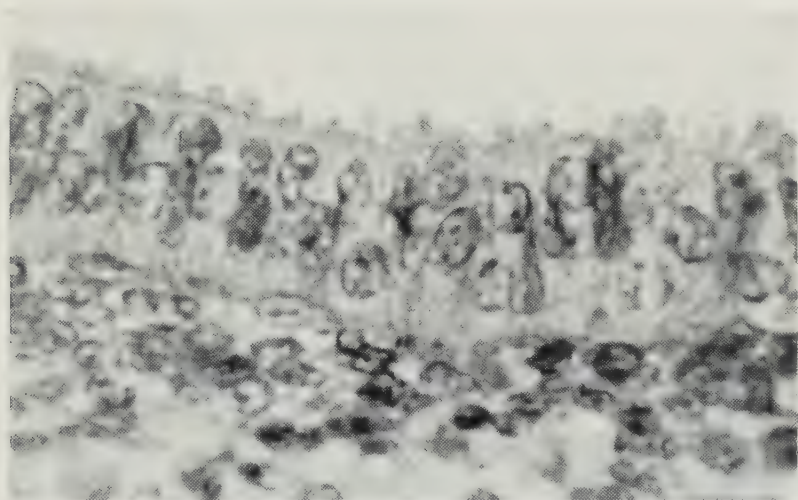


Fig. 6. Polmone espiantato al 4° giorno di incubazione e coltivato per 5 giorni e mezzo. Secrezione vescicolare dell'epitelio di un bronco primario. Zenker, Ematossilina e eosina. $\times 1300$

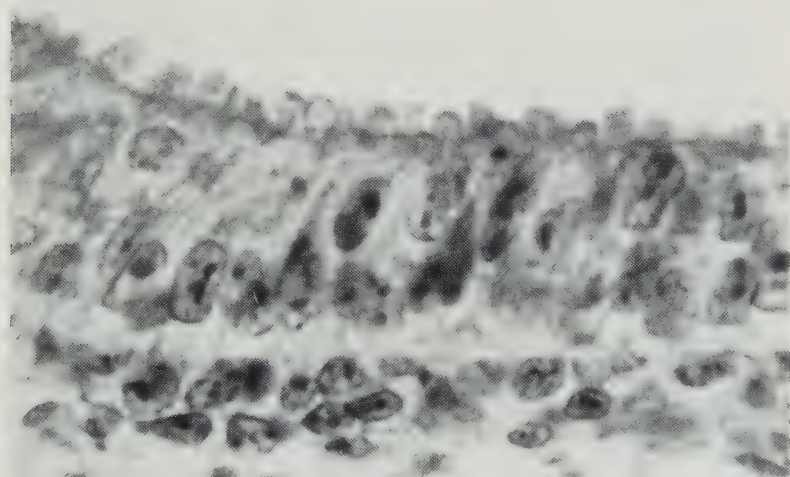


Fig. 7. Polmone di embrione incubato per 8 giorni. Secrezione vescicolare dell'epitelio di un bronco primario. Zenker, Ematossilina e eosina. $\times 1300$

L'epitelio delle gemme secondarie tende invece ad abbassarsi a mano a mano che esse crescono in lunghezza, e dopo qualche giorno di cultura è facile distinguere le gemme secondarie per il loro epitelio monostratificato, ora cilindrico, ora cubico.

La continuazione dell'epitelio alto di un bronco primario con quello basso di una piccola gemma all'inizio della sua formazione, è visibile nella Fig. 8, ed il confronto con la Fig. 9, che rappresenta un fatto simile in un embrione della

stessa età totale sviluppatosi in condizioni normali, dimostra che la cultura in vitro non modifica il processo di appiattimento dell'epitelio.

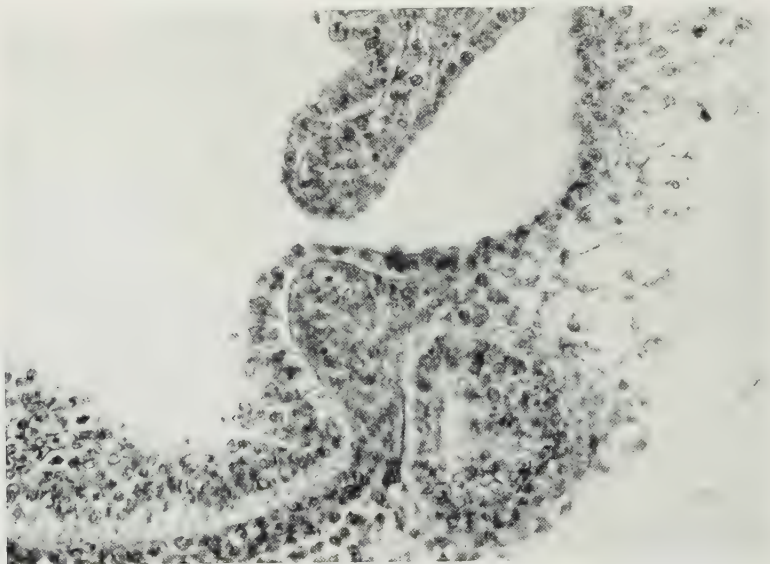


Fig. 8. Polmone espantato al 5° giorno di incubazione e coltivato per 3 giorni. Continuazione dell'epitelio alto pseudostratificato di un bronco primario (a sinistra) con l'epitelio basso di un bronco secondario (a destra). Susa. Azan. $\times 395$

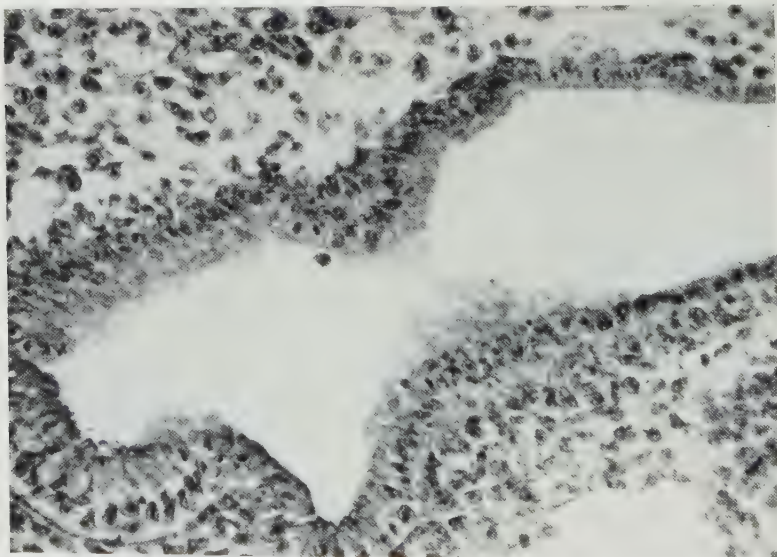


Fig. 9. Polmone di embrione incubato per 8 giorni. Continuazione dell'epitelio pseudostratificato di un bronco primario (a sinistra) con l'epitelio basso di un bronco secondario (a destra). Zenker. Ematossilina e eosina. $\times 395$

I bronchi terziari o parabronchi si presentano in forma di sottili condotti epiteliali di calibro uniforme; in essi non si riproduce la forma clavata caratteristica dei rami di secondo ordine. Essi si allungano nel mesenchima, e la loro

parete è costituita per tutta la loro estensione da un epitelio cubico monostratificato costituito da cellule con grosso nucleo rotondo centrale. Similmente a quanto avviene nello sviluppo dell'embrione di un mammifero precedentemente studiato, il topo (ALESCIO 1960b), l'abbassamento dell'epitelio si inizia alla radice dei bronchi secondari e si completa nei bronchi di terzo ordine, funzionalmente comparabili ai bronchioli del polmone dei mammiferi, in quanto da essi prenderanno origine successivamente i capillari aeriferi che costituiscono il vero parenchima respiratorio in senso stretto.

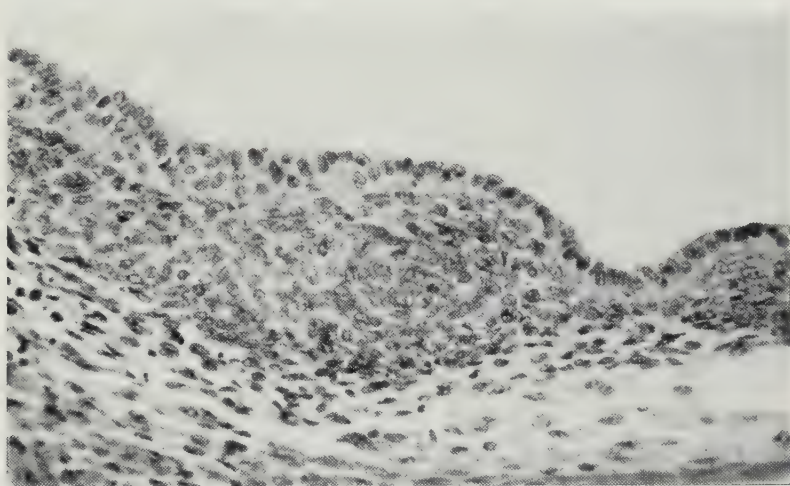


Fig. 10. Polmone espiantato al 4° giorno di incubazione e coltivato per 5 giorni. A sinistra si osserva il manicotto mesenchimale sotto l'epitelio pseudostratificato di un bronco primario; a destra, dove si trova la continuazione con un bronco secondario, tanto l'epitelio quanto il manicotto mesenchimale si assottigliano. Zenker. Ematossilina e eosina. $\times 395$

Gli addensamenti mesenchimali descritti attorno alla trachea e ai bronchi primari fino dal momento dell'espianto si mantengono anche in prossimità dell'epitelio dei rami di secondo e di terzo ordine formati in cultura, ed il loro spessore diminuisce passando ai successivi ordini di bronchi (Fig. 10), fino a che attorno ai bronchi di terzo ordine rimangono solo poche file di cellule mesenchimali strettamente addossate all'epitelio.

Nel mesenchima che circonda la trachea si può osservare, dopo alcuni giorni di cultura, la comparsa delle prime fibrocellule muscolari lisce, come appare (Fig. 11) in un polmone espiantato a 4 giorni e coltivato per 5 giorni.

La membrana basale segue ininterrottamente ogni nuovo ramo epiteliale neoformato, pur essendo più sottile e delicata e difficilmente visibile in corrispondenza delle più giovani gemme epiteliali.

Dalla superficie dell'epitelio dei bronchi di diverso calibro e talvolta anche da quella dei tratti terminali con epitelio più sottile, si osservano qua e là cellule che evidentemente sono nell'atto di distaccarsi, acquistano un nucleo di forma sferica e si ritrovano nel lume. Immagini di questo tipo si vedono in culture di varia età e in punti diversi dell'epitelio. Nella Fig. 12 ne sono riprodotte alcune, il cui nucleo ha la stessa struttura di quello delle cellule epiteliali ma forma allungata e clavata e che sembrano nell'atto di distaccarsi dall'epitelio, mentre

un'altra dal nucleo ormai sferico è già staccata e contenuta nel lume. Nella Fig. 13 se ne vede un'altra decisamente staccata, proveniente anch'essa da un

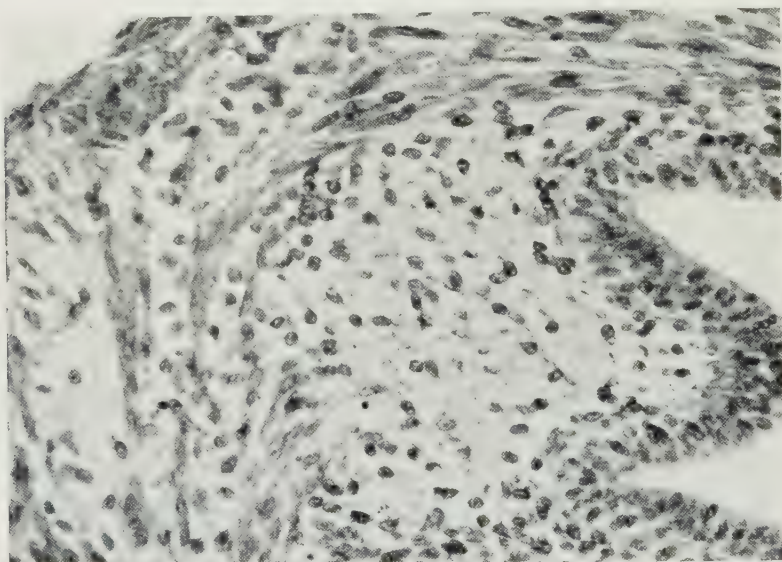


Fig. 11. Polmone espiantato al 4° giorno di incubazione e coltivato per 5 giorni. Fibrocellule muscolari differenziate in cultura. Zenker. Ematossilina e eosina. $\times 395$

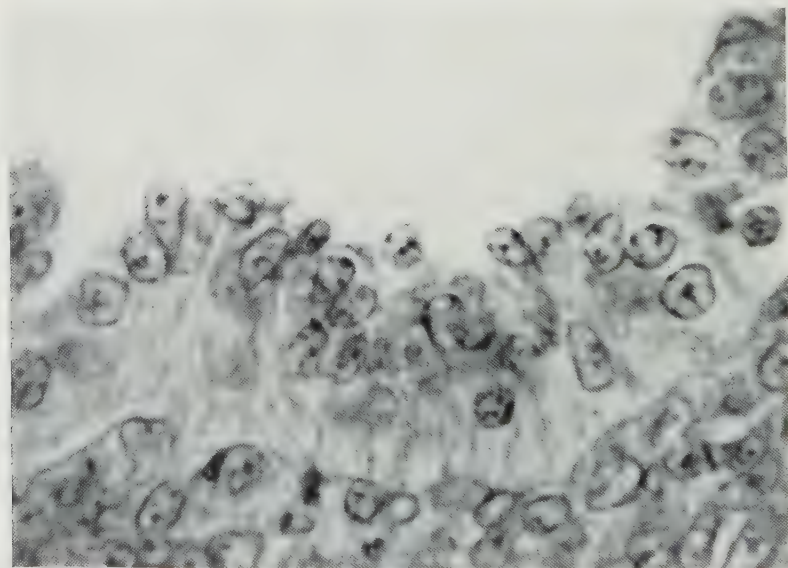


Fig. 12. Polmone espiantato al 5° giorno di incubazione e coltivato per 4 giorni. Vi si vedono cellule nell'atto di distaccarsi dall'epitelio bronchiale. Una di tali cellule a sinistra ha il nucleo fusiforme; al centro se ne osserva una dal nucleo sferico già staccata. Zenker. Ematossilina e eosina. $\times 1300$

epitelio bronchiale piuttosto alto, come nel caso della figura precedente. Tale reperto non è però limitato ai bronchi più grossi con epitelio pseudostratificato: anche in tratti più periferici dell'albero bronchiale dove l'epitelio è divenuto cubico il fenomeno si ripete abbastanza frequentemente (Fig. 14).

Qualunque sia l'interpretazione che si voglia dare a questi reperti, che si trovano qua e là in gran parte delle culture, esso non ha alcun carattere di fatto

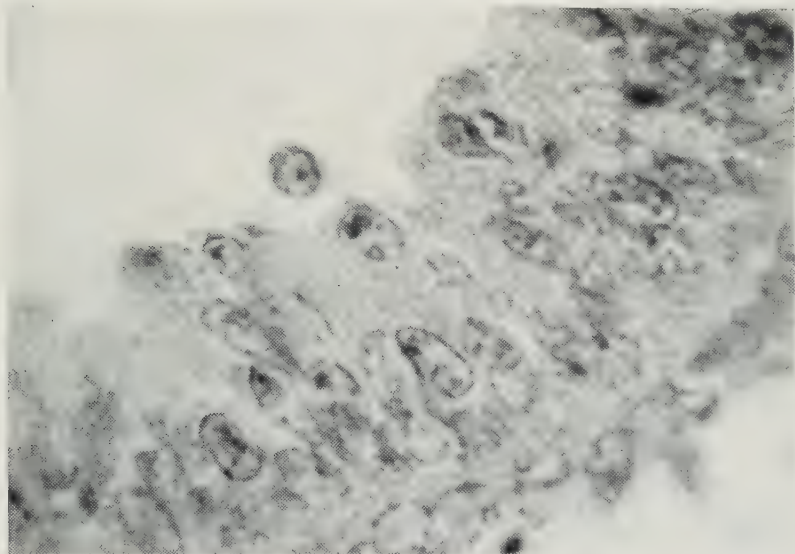


Fig. 13. Polmone espiantato al 5° giorno di incubazione e coltivato per 4 giorni e mezzo. Cellula sferica già distaccata e contenuta nel lume. Zenker. Ematossilina e eosina. $\times 1300$

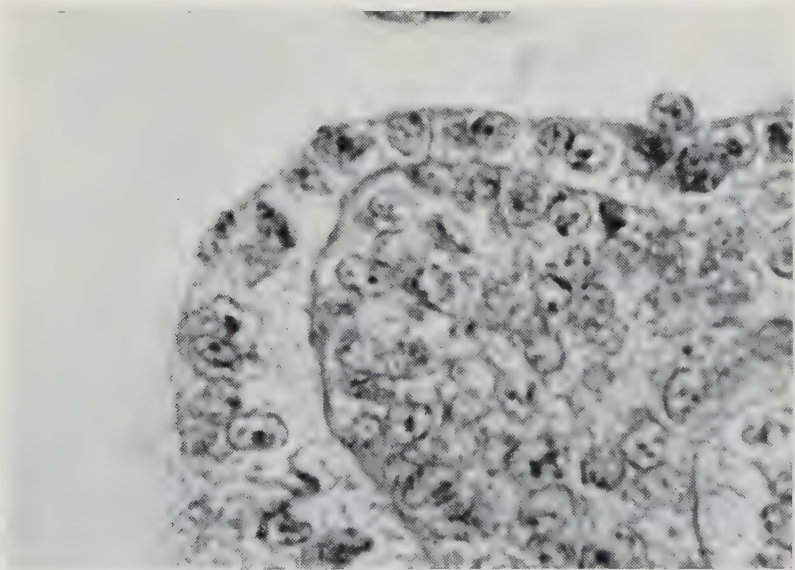


Fig. 14. Polmone espiantato al 5° giorno di incubazione e coltivato per 3 giorni. Cellula sferica sul punto di staccarsi dall'epitelio cubico di un bronco secondario. Susa. Azan. $\times 1300$

degenerativo, come si deduce dal fatto che i nuclei delle cellule staccate hanno un aspetto del tutto normale. Ad ogni modo poi, e ciò è anche più importante, si tratta della riproduzione, in condizioni di cultura, di un fenomeno che appare anche nello sviluppo normale. Si confrontino a questo proposito le tre figure

sopra citate con la Fig. 15, che rappresenta un particolare di un bronco osservato in una sezione di polmone di pollo al 10° giorno di incubazione: alla super-

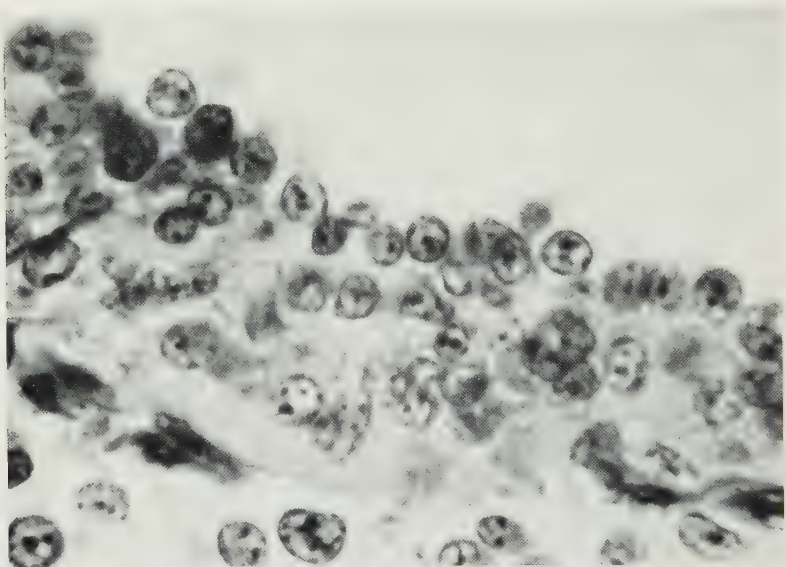


Fig. 15. Polmone di embrione incubato per 10 giorni. Cellule sferiche che appaiono nell'atto di staccarsi. Susa. Azan. $\times 1300$

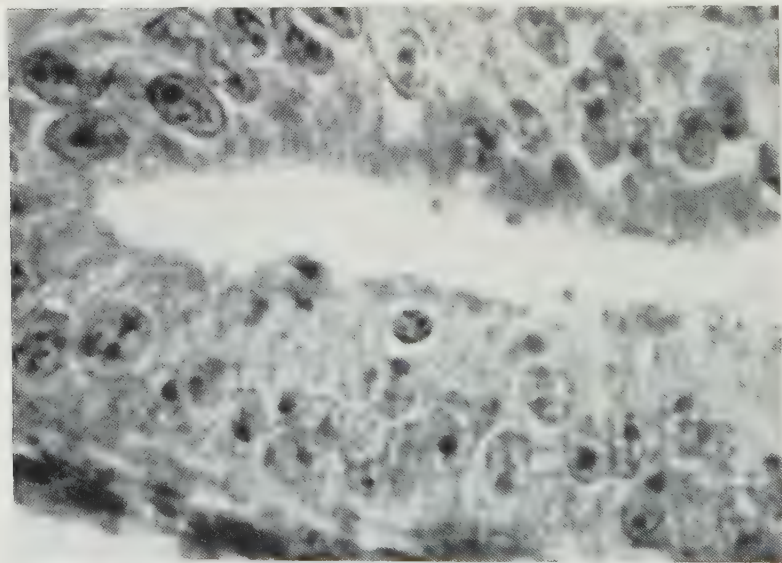


Fig. 16. Polmone espiantato al 5° giorno di incubazione e coltivato per 3 giorni. Una cellula sferica dall'aspetto di cellula migrante, contenuta nell'epitelio bronchiale. Zenker. Ematossilina e eosina. $\times 1300$

ficie di un epitelio bronchiale si vedono molte cellule dal nucleo sferico in atto di staccarsi.

Si deve per altro osservare che non in tutti i casi la presenza di cellule sferiche alla superficie corrisponde alla deformazione ed al distacco di cellule epiteliali:

vi sono inoltre, meno frequenti ma abbastanza caratteristiche, immagini che sembrano dimostrare, nell'epitelio bronchiale dei polmoni coltivati *in vitro* come

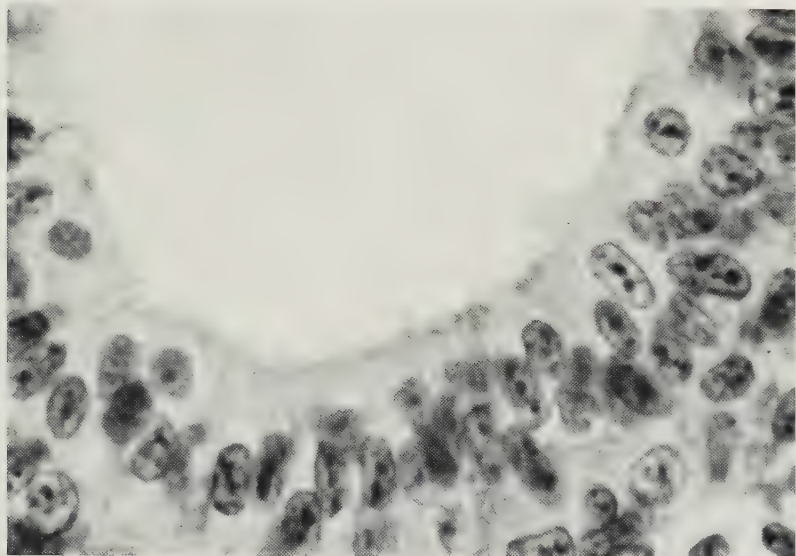


Fig. 17. Polmone espiantato al 5° giorno di incubazione e coltivato per 3 giorni. Cellule sferiche nell'epitelio bronchiale, dall'aspetto di cellule migranti. Zenker. Ematossilina e eosina. $\times 1300$

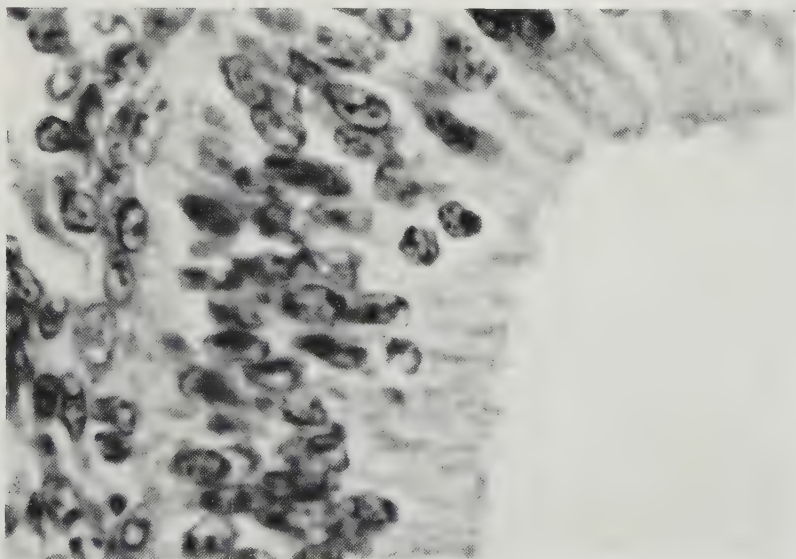


Fig. 18. Polmone di embrione incubato per 10 giorni. Due cellule sferiche dall'aspetto di cellule migranti entro l'epitelio. Zenker. Ematossilina e eosina. $\times 1300$

pure in quelli sviluppatasi in condizioni naturali, l'esistenza di una migrazione di cellule sferiche, apparentemente estranee all'epitelio stesso e che ricordano i caratteri della così detta migrazione linfoepiteliale, descritta in vari organi e non solamente in quelli di struttura sicuramente linfoepiteliale come nella tonsilla palatina (LORETI 1933) o nella borsa di FABRIZIO (JOLLY 1911, 1914/15)

ma anche in organi di ben diversa struttura, come il rene dei teleostei (LORETI 1934).

Nelle culture qui studiate certamente mancano focolai di linfopoiesi situati nel mesenchima da cui si possono ritenere derivati eventuali linfociti, e si dovrebbe pensare perciò ad una migrazione di cellule mesenchimali non differenziate in modo preciso ma certamente modificate nella forma: tuttavia difficilmente si può negare l'aspetto di una cellula migrante a quella riprodotta nella Fig. 16, dove si vede, nella porzione più vicina al lume dell'epitelio cilindrico di un bronco, un nucleo addensato, circondato da un alone chiaro, che riproduce molto da vicino l'immagine ben nota delle così dette cellule «linfoidi» che attraversano l'epitelio. Almeno due, forse tre cellule analoghe si osservano nella Fig. 17, sebbene in questo caso la struttura nucleare non sia nettamente diversa da quella delle cellule cilindriche.

Si osservi ad ogni modo che questi reperti, comunque si vogliano interpretare, si trovano, sia pure con scarsa frequenza, come del resto nelle culture, anche nello sviluppo normale: un esempio appare nella Fig. 18.

Considerazioni generali

Finora sono state considerate, specialmente a proposito dei fenomeni citologici più fini, le somiglianze fra lo sviluppo del polmone di pollo *in vitro* e quello in condizioni naturali, o *in vivo* come generalmente si dice. Rimangono ora da esporre le diversità.

Il processo di ramificazione presenta alcune importanti differenze che riguardano sia la disposizione spaziale sia il numero dei rami.

Nello sviluppo *in vivo* l'emissione dei bronchi secondari avviene secondo molti piani passanti per l'asse del mesobronco, e i bronchi secondari sono liberi di allungarsi in ogni direzione possibile e di incurvarsi nella maniera caratteristica propria a ciascuno di essi. L'orientamento che in tal modo vengono assumendo ha permesso, come ho ricordato sopra, di suddividerli in quattro gruppi, cui è stato dato rispettivamente il nome di entobronchi, ectobronchi, dorsobronchi e laterobronchi.

Nelle condizioni di cultura adottate, l'unica direzione di crescita consentita ai bronchi secondari è quella definita dalla superficie del coagulo. L'espianto risulta dunque appiattito ed i bronchi secondari disposti su di un unico piano.

Un altro carattere che distingue lo sviluppo *in vitro* da quello *in vivo*, concerne il numero delle ramificazioni. L'albero bronchiale del polmone coltivato comincia la sua formazione in un primo momento in modo simile a quello dello sviluppo normale, ma la sua capacità di dare nuovi rami di ordine successivo va rapidamente declinando, così che non raggiunge mai la complessità che avrebbe raggiunto nello stesso tempo in condizioni naturali. In altri termini l'abbozzo coltivato, pur risultando analogo, nella sua struttura a quello che si viene formando nello sviluppo naturale, è molto più povero di ramificazioni, e rappresenta in qualche modo uno schema semplificato di quello che è il normale polmone embrionale.

Si tratta di un fenomeno di cui è difficile dare una spiegazione soddisfacente, ma che ad ogni modo rappresenta un caso di quel rallentamento dei processi

di morfogenesi che si presenta come fenomeno molto frequente in tutte le ricerche finora compiute su organi coltivati *in vitro* (BORGHESE 1955, 1958).

Un'altra considerevole differenza si osserva nello sviluppo dei sacchi aeriferi. Queste formazioni, peculiari del polmone degli uccelli, esistono, come si è visto in numero di cinque: cervicali, interclavicolare, anteriori, posteriori, addominali; a questi vanno aggiunti i piccoli sacchi aeriferi della siringe (ROMANOFF 1960). I sacchi aeriferi addominali derivano direttamente dall'estremo caudale del mesobronco, mentre gli altri prendono origine dai bronchi secondari: dal nono giorno di incubazione tutti i sacchi aeriferi sporgono dalla la superficie polmonare.

Nello sviluppo *in vitro* il sacco aerifero addominale, quando si tratti di espianti provenienti da embrioni che abbiano raggiunto il 5° giorno di incubazione, appare inizialmente con forma e dimensioni simili a quelli dello sviluppo *in vivo*. Tuttavia la sua direzione di crescita è atipica, in quanto invece di dirigersi caudalmente fino a sporgere dalla superficie dell'organo come una propaggine clavata, tende a ripiegarsi in senso craniale, come si vede nelle Fig. 3 e 4. Non compaiono in alcun modo gli abbozzi degli altri sacchi, che dovrebbero formarsi per gemmazione dei bronchi secondari, o, anche se le loro gemme iniziano la formazione, non arrivano a distinguersi da quelle dei bronchi di terzo ordine, ed in nessun caso si rendono sporgenti dalla superficie esterna del polmone.

Si deve perciò supporre che, mentre l'abbozzo polmonare espantato al 5° giorno di incubazione contiene in sé la capacità di formare rami bronchiali di ordini successivi secondo un modello abbastanza simile a quello normale, viene a mancare nelle condizioni di isolamento della cultura qualche azione necessaria alla formazione dei quattro sacchi aeriferi craniali, o almeno all'esatto orientamento spaziale dei loro abbozzi.

Oltre ai fatti finora descritti, che sono dedotti dallo studio della massima parte delle culture, si osservano, peraltro in casi rari e saltuari, anomalie di sviluppo evidentemente dovute a condizioni di cultura occasionali e particolarmente sfavorevoli, perciò non tipiche, e delle quali si farà brevemente cenno.

Le cavità bronchiali possono talvolta dilatarsi in maniera abnorme, presumibilmente a causa di un eccesso di secrezione o di filtrazione di acqua attraverso l'epitelio. In tal caso le gemme bronchiali, preesistenti o formate in cultura, si trasformano in grandi cavità cistiche rivestite da un epitelio che può divenire fortemente appiattito. Le cavità così dilatate non sono capaci di dare origine a nuovi rami di divisione.

In altri casi, pure rari, l'epitelio bronchiale dimostra di conservare la propria attività proliferativa pur avendo perso la capacità di dare origine a strutture morfologicamente normali. Si arriva allora alla formazione di quadri nettamente atipici, consistenti in agglomerati di digitazioni a lume strettissimo e di varia misura, disordinatamente invadenti il mesenchima circostante, qualche volta fornite persino di un'apertura sulla superficie dell'organo. In alcuni punti di queste curiose formazioni è molto difficile e talvolta impossibile distinguere un limite preciso tra epitelio e mesenchima.

L'imbibizione del mesenchima, fenomeno entro certi limiti normale della cultura, può essere talvolta particolarmente imponente: il mesenchima si presenta in tal caso fortemente rarefatto per la presenza di un gran numero di vacuoli otticamente vuoti, il cui aspetto richiama in sezione quello del tessuto adiposo,

delimitati da una trama di rare e fini fibrille colorabili col blu di anilina del metodo Azan. Anche i densi manicotti mesenchimali di vario spessore normalmente presenti attorno ai vari ordini di gemme bronchiali, possono essere in tutto o in parte dissociati e dispersi, e ridursi di spessore fino a non essere più riconoscibili.

La presenza nell'espianto di una qualsiasi di queste alterazioni mesenchimali o epiteliali, tra le quali peraltro non è stato possibile stabilire un rapporto causale, disturba la morfogenesi dell'abbozzo, che richiede per evolversi normalmente una buona conservazione dell'epitelio e del mesenchima.

Si può dunque concludere che il polmone dell'embrione di pollo, espantato allo stadio in cui è iniziata la formazione di almeno uno dei bronchi secondari, è capace di continuare, in condizioni di isolamento rispetto all'intero organismo, il suo sviluppo morfologico ed istologico, così da riprodurre, entro certi limiti, le linee essenziali dei processi morfogenetici che si sarebbero svolti in condizioni naturali.

L'abbozzo polmonare ha dunque raggiunto, poco dopo la sua comparsa, un'autonomia sufficiente che gli permette di svilupparsi in assenza della collaborazione dell'intero organismo, ed indipendentemente dalla circolazione sanguigna, mantenendo la possibilità di riprodurre, oltre che le linee generali dell'albero bronchiale, anche particolarità istologiche fini, come l'assottigliarsi dell'epitelio nei rami di secondo e di terzo ordine, la secrezione vescicolare, il distacco di molte cellule epiteliali ed il loro passaggio nel lume, la comparsa di immagini che sembrano indicare il passaggio di cellule rotonde di origine presumibilmente mesenchimale attraverso l'epitelio.

Riassunto

L'autore ha studiato lo sviluppo *in vitro* del polmone embrionale di pollo, espantato a 4 e 5 giorni di incubazione e tenuto in cultura fino ad un massimo di 5 giorni. Il processo di ramificazione dell'albero bronchiale continua in cultura, e può essere seguito direttamente, mediante l'osservazione della cultura allo stato vivente, fino a che la ramificazione non diviene troppo complicata.

L'esame istologico delle culture dimostra la comparsa di fenomeni molto simili a quelli che avvengono nelle condizioni normali di sviluppo, come viene dimostrato dal confronto fra le culture e polmoni di embrioni di pollo dal 5^o al 10^o giorni di incubazione. In particolare si sono osservati nelle culture: la secrezione vescicolare dell'epitelio della trachea e dei bronchi, fenomeni di migrazione cellulare attraverso l'epitelio, l'assottigliarsi dell'epitelio verso le ultime ramificazioni corrispondenti ai capillari aeriferi, il distacco di cellule dall'epitelio dei bronchi e dei piccoli rami e la loro caduta nel lume.

In confronto allo sviluppo normale si osserva nelle culture una minore rapidità di ramificazione e la scomparsa dei sacchi aeriferi addominali.

Bibliografia

- ALESCIO, T.: Culture organotipiche di polmone embrionale di pollo. Boll. zool. **26**, 529—536 (1959).
— Osservazioni preliminari sullo sviluppo „in vitro“ del polmone di pollo. Monit. zool. ital. **68**, Suppl., 199—206 (1960a).

- ALESCIO, T.: Osservazioni su culture organotipiche di polmone embrionale di topo. Arch. ital. Anat. Embriol. **65**, 323—363 (1960b).
- BARGMANN, W.: Zur vergleichenden Histologie der Lungenalveole. Z. Zellforsch. **23**, 335—360 (1936).
- BORGHESE, E.: Explantation experiments on the influence of the connective tissue capsule on the development of the epithelial part of the submandibular gland of *Mus musculus*. J. Anat. (Lond.) **84**, 303—318 (1950).
- Lo sviluppo di organi embrionali isolati. Monit. zool. ital. **63**, Suppl., 50—138 (1955).
- Organ differentiation in culture. In W. D. McELROY and B. GLASS, A symposium on the chemical basis of development, p. 704—773. Baltimore: Johns Hopkins University Press 1958.
- DANESINO, V.: Sulla differenziazione del connettivo stromale del polmone embrionale dell'uomo e dei mammiferi. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **22**, 800—802 (1946).
- FELL, H. B., and R. ROBISON: The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb buds cultivated in vitro. Biochem. J. **23**, 767—784 (1929).
- GROBSTEIN, C.: Tissue interaction in the morphogenesis of mouse embryonic rudiments in vitro. In D. RUDNICK, Aspects of synthesis and order in growth, p. 233—256. Princeton: Princeton University Press 1955.
- JOLLY, J.: La bourse de Fabricius et les organes lympho-éithélieux. C. R. Ass. Anat. **13**, 164—176 (1911).
- La bourse de Fabricius et les organes lympho-éithélieux. Arch. Anat. micr. Morph. exp. **16**, 363—547 (1914/15).
- JONG, B. J. DE, and J. DE HAAN: Organ and tissue differentiation in perfused cultures of explants from oesophagus-stomach-trachea complex of young chicken embryos. Acta neer. Morph. **5**, 26—51 (1943).
- KEUNING, F. J.: Histogenesis and origin of autonomic nerve plexus in the upper digestive tube of the chick. Acta neer. Morph. **6**, 1—35 (1948).
- LARSELL, O.: The development of recurrent bronchi and air-sacs of the lung of the chick. Anat. Anz. **47**, 481—496 (1914/15).
- LILLIE, F. R.: Development of the chick. Revised by H. L. HAMILTON. New York: Holt 1952.
- LOCY, W. A., and O. LARSELL: The embryology of bird's lung based on observations of the domestic fowl. Amer. J. Anat. **19**, 447—504 (1916); **20**, 1—44 (1916).
- LOFFREDO SAMPAOLO, C., e G. SAMPAOLO: A proposito della coltivazione di abbozzi completi di organi: alcuni aspetti istologici del polmone di embrione di pollo coltivato in vitro. R. C. Accad. Sci. med.-chir., Napoli **110**, 3—6 (1956a).
- Culture organotipiche di polmone embrionale di pollo. Alcuni aspetti istologici ed istochimici. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **32**, 797—801 (1956b).
- Alcuni aspetti istologici della trachea in culture organotipiche di apparato respiratorio di embrioni di pollo. R. C. Accad. Sci. med.-chir., Napoli **111**, 3—10 (1957a).
- Indagini sulla differenziazione in cultura organotipica della trachea di embrioni di pollo. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **33**, 173—176 (1957b).
- Les aspects histologiques de l'appareil respiratoire dans l'embryon de poulet après culture in vitro. C. R. Ass. Anat. **99**, 448—460 (1958).
- Indagini sperimentali sullo sviluppo del polmone embrionale. Quad. Anat. prat. **17**, 1—43 (1961).
- LORETI, F.: Osservazioni e considerazioni sulla infiltrazione linfoide e leucocitaria nell'epitelio della tonsilla palatina. Boll. Soc. med.-chir. Pavia **47**, 727—766 (1933).
- Nuove ricerche ed osservazioni sulla migrazione di cellule linfoide attraverso il tessuto epiteliale. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. **103**, 679—693 (1934).
- ROMANOFF, A. L.: The avian embryo. New York: Macmillan 1960.
- ROSNER, H.: Über die erste Anlage der Lungen und der Nebengekröse einiger Vogelarten. Anat. H. **44**, 525—622 (1911).
- RUDNICK, D.: Developmental capacities of the chick lung in chorioallantoic grafts. J. exp. Zool. **66**, 125—154 (1933).
- SCROCCA, P.: Sopra alcuni caratteri istologici dello stroma e sulle disposizioni vasali del polmone in un particolare momento di vita fetale dell'uomo. Quad. Anat. prat. **1**, 69—86 (1942).

- SELENKA, E.: Beitrag zur Entwicklungsgeschichte der Luftsäcke des Huhns. *Z. wiss. Zool.* **16**, 178—182 (1866).
- WEBER, A.: Nouvelles recherches sur le développement du poumon chez les oiseaux. *C. R. Ass. Anat.* **23**, 478—479 (1928).
- , et A. BUVIGNIER: Les premières phases du développement du poumon chez les embryons de poulet. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **55**, 1394—1396 (1903).
- WOLFF, EM.: La différenciation sexuelle de la syrinx de l'embryon de canard, explantée in vitro sur des milieux chimiquement définis. *Bull. biol. France et Belg.* **91**, 271—283 (1957a).
- Nouvelles recherches sur la culture organotypique de la syrinx d'oiseau. Culture sur différents milieux naturels et amélioration des ces milieux par des acides aminés. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.* **46**, 1—38 (1957b).
- Analyse des besoins nutritifs d'un organe embryonnaire, la syrinx d'oiseau cultivée en milieu synthétique. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.* **46**, 407—468 (1957c).
- WOLFF, ET., et EM. WOLFF: Le déterminisme de la différenciation sexuelle de la syrinx du canard cultivée in vitro. *Bull. biol. France et Belg.* **86**, 325—349 (1952).

Dr. TOMMASO ALESCIO,

Frascati (Roma), Italia, Sincrotrone Casella Postale n. 15

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.
2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten, rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen

1. Das Manuskript muß leicht leserlich (möglichst in Maschinenschrift) geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern beizufügen. Diktierte Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn mit ihnen ein neuer Gedankengang beginnt.
2. Die Arbeiten müssen *kurz* und stilistisch einwandfrei geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen“, Handbüchern) herzustellen.
3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.
4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in einer der Kongreßsprachen abgefaßt sein kann.
5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur ein Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knapster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen, durch eine Fußnote daraufhinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.
6. Die *Abbildungen* sind auf das unbedingt Notwendige zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur zur Illustration von Befunden dienen und ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. Knappe, klare Abbildungsunterschriften (Legenden) erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Sie sind getrennt von den Abbildungen dem Manuskript im Anschluß an das Literaturverzeichnis beizufügen. Unzulässig ist die *doppelte* Darstellung in Abbildung und Kurve. Bereits veröffentlichte Abbildungen können nicht wiederholt werden. Ausnahmen hiervon sind nur in besonders begründeten Fällen möglich. *Farbige* Bilder können in der Regel keine Aufnahme finden. Für Kurven oder Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden können, genügt die Ablieferung sauberer, klarer Skizzen, die vom Verlag ungezeichnet werden. Bei Halbtönen (Photos, Mikrophotos, Halbtönenzeichnungen) sind saubere, scharfe und tonwertreiche Originalvorlagen (Hochglanzabzüge von Originalphotographien) notwendig. Besondere Wünsche des Autors hinsichtlich des linearen Verkleinerungs- und Vergrößerungsmaßstabes der Vorlagen sollen hervorsicht werden.
- Die *Beschriftung* der Abbildungen mit Buchstaben oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise hierfür sollen keinesfalls in der Abbildung selbst, sondern auf einem darüberliegenden transparenten Deckblatt angegeben werden. Dort sind auch Abstriche oder gewünschte Bildausschnitte zu bezeichnen. Hinweis Pfeile oder -linien sind ebenfalls auf dem Deckblatt anzubringen, wobei die Endpunkte durch Einstich mit einer feinen Nadel auf der darunterliegenden Originalvorlage fixiert werden sollen. Es empfiehlt sich ferner, auf dem Deckblatt wichtige Abbildungspartien zu kennzeichnen, damit die Kunstanstalt bei der Ätzung ihr besonderes Augenmerk darauf richten kann.
7. Literaturangaben sollen Autorennamen, vollständigen Titel der Arbeit, Zeitschrift, Band- und Seitenzahl sowie Jahreszahl umfassen [z.B. Böke, W.: Untersuchungen des Linsenepithels mit dem Phasenkontrastmikroskop. Z. Zellforsch. 38, 428—454 (1953)]. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alphabetisch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammern gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.
8. Methodik, Protokolle und weniger wichtige Teile des Textes sind für *Kleindruck* vorzuzeichnen. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.
9. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.
10. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig sind einzelne Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet oder wer die Mittel dazu gegeben hat. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

American Society for Cell Biology

The newly formed American Society for Cell Biology has announced its first regular meeting and has issued a call for papers. The meeting will be held November 2, 3, and 4, 1961, in Chicago, Illinois at the Edgewater Beach Hotel. A program of three symposia, contributed papers, demonstrations and motion pictures is being arranged. The symposia with invited speakers from the U.S. and abroad, reflect the Society's aim to transcend disciplinary boundaries and bring together workers with divergent approaches in an effort to focus on fundamental problems of the cell. The topics will cover the following:

- I. Cell continuity: The molecular, ultrastructural and genetic aspects of replicating systems of the nucleus and cytoplasm.
- II. Cell diversification: Clonal diversity in cell structures and aspects of differentiation in plant and animal cells.
- III. Characteristics of cell interfaces: The chemistry and the fine structure of cell membrane systems, and problems of transport across membranes.

All interested cell biologists, whether they are members or not, are invited to submit papers (15 minute presentation time including discussion) for the contributed papers sessions. Demonstration papers and motion pictures are also solicited.

The Program Committee includes the following:

- Dr. TERU HAYASHI, Columbia U.
Dr. HEINZ HERMANN, U. Connecticut
Dr. ROBERT KING, Northwestern U.
Dr. HANS RIS, U. Wisconsin
Dr. A. K. SOLOMON, Harvard Medical School
Dr. HERBERT STERN, U. Illinois

Further information about the Society or the meeting may be obtained from the Acting Secretary, Dr. M. J. MOSES, Box 2982, Duke University School of Medicine, Durham, North Carolina.

M. J. Moses
Acting Secretary